

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología
Área de Nutrición y Bromatología



Desarrollo de Métodos Analíticos para la Valoración
Nutricional del Cangrejo de las Nieves, Chionoecetes Opilio

Memoria para optar al grado de doctor

MARÍA VILASOA MARTÍNEZ

Santiago de Compostela, Marzo de 2008

**Dr. ALBERTO CEPEDA SAEZ, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO
DE QUÍMICA ANALÍTICA, NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA DE
LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**

INFORMA: Que Dña. María Vilasoa Martínez presenta el trabajo titulado
“DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA
VALORACIÓN NUTRICIONAL DEL CANGREJO DE LAS NIEVES,
CHIONOECETES OPILIO” realizado bajo la dirección de la Dra. Julia
López Hernández y de la Dra. María Asunción Lage Yusty, en los
laboratorios de Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad
de Santiago de Compostela.

Fdo. Dr. D. Alberto Cepeda Saez

Santiago de Compostela, Marzo de 2008

JULIA LÓPEZ HERNÁNDEZ Y MARIA ASUNCIÓN LAGE YUSTY
PROFESORA TITULAR Y CATEDRÁTICA, DEL ÁREA DE
NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

AUTORIZAN a Dña María Vilasoa Martínez a presentar la Tesis titulada
“DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA
VALORACIÓN NUTRICIONAL DEL CANGREJO DE LAS NIEVES,
CHIONOECETES OPILIO” para optar al Grado de Doctor, la cual ha sido
realizada bajo nuestra dirección en los en laboratorios de Bromatología de la
Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, se expide la presente en Santiago de Compostela en
Marzo de 2008.

Fdo. Dra. Dña. Julia López Hernández

Fdo. Dra. Dña. María Asunción Lage Yusty

Fdo. Dña. María Vilasoa Martínez

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de esta tesis,

A las Directoras de este trabajo, la Dra. Julia López Hernández, por su constante asesoramiento y por ofrecerme la orientación y apoyo que siempre he necesitado y la Dra. María Asunción Lage Yusty, por su dedicación, paciencia y confianza desde el principio de este trabajo.

Al Dr. Jesús Simal Lozano, por su interés, conocimientos y experiencia mostrados durante estos años.

Al Dr. Perfecto Paseiro Losada y al Dr. José Francisco Huidobro Canales, por su atención y amabilidad, y por haber contribuido en gran parte a mi formación académica.

Al Dr. José Manuel Cruz, por prestarme su ayuda cuando estaba perdida.

A todos los que empezaron siendo compañeros de trabajo y que ahora considero mis mejores amigos y confidentes, Susana Álvarez, Patricia Blanco, Carina Calaza, Patricia Ferraces, Gonzalo Hermelo, David Pereira y Ana Rodríguez.

A los chicos en prácticas y a los que han hecho alguna estancia que han dejado su granito de arena en el departamento, Belén, Catherina, Cristina, Fany, Javier, Letrizia, Lois y Xaquín.

A la Dra. Raquel Sendón, por su generosidad, amistad y su valiosa ayuda cuando la necesité.

A la Dra. María Punín, por todo lo que me ha ofrecido y por todo lo que me ha enseñado. Mi agradecimiento va más allá de las palabras. Gracias por seguir estando ahí.

A la Dra. Ana Teresa Sanches Silva, por su apoyo incondicional, por su ayuda en momentos de estrés total y como no por su sencillez y dulzura.

A otros compañeros de trabajo que quedaron atrás, pero que todavía están presentes en el Departamento de Botánica, Ramiro, Belén, Roy, Iñigo y Esther.

A la Dra. Ángeles Dopazo, por haber pasado tantas horas enseñándome y aconsejándome y por haberme demostrado que la vida hay que vivirla siempre con alegría. Es un ejemplo a seguir.

A mi familia, por su cariño y apoyo. A mi madre por haber sufrido lo que yo he sufrido o incluso más, por haber pasado tantas horas a mi lado, por subirme la moral cuando estaba baja, por haber luchado incondicionalmente para que llegase hasta aquí, por estar siempre ahí. A mi padre, por lo que me ha enseñado, por su esfuerzo y por sus consejos siempre acertados. Gracias por su confianza.

A mi marido, por estar siempre a mi lado y apoyarme en los peores momentos de mi vida. Y por supuesto por decidir compartir toda una vida conmigo.

A mi hijo, Lois, mi pilar fundamental, mi mayor tesoro, mi vida.

A la Xunta de Galicia por la concesión del proyecto PGIDIT03BTF00701CT.

A D. Julio Maroto Leal del Centro Tecnológico del Mar, que nos animó a participar en este Proyecto y con el que hemos colaborado en la realización del mismo.

A la Casa Armadora Hermanos Gandón por la recogida, conservación y facilitación de las muestras.

Y por último a todos aquellos que, de una forma u otra han colaborado durante este tiempo no sólo a la realización de este trabajo sino a mi formación científica en general.

A todos ellos, gracias.

A mis padres

A mi marido y a mi hijo

ÍNDICE GENERAL

I-Introducción	1
I-1. Cangrejo de las Nieves, <i>Chionoecetes opilio</i>	3
I-1.1. Características generales. Distribución y ecología	3
I-1.2. Ciclo biológico	5
I-1.3. Explotación comercial	8
I-1.4. Captura y aprovechamiento	11
I-2. Subproductos de pesca	12
I-3. Muestras (captura y preparación)	15
I-4. Objetivos del trabajo	21
Bibliografía	27
II- Determinación de vitamina E y pigmentos carotenoides	31
II-1. Introducción	35
II-2. Parte experimental	37
II-2.1. Material y aparatos	37
II-2.2. Patrones	37
II-2.3. Reactivos	38
II-2.4. Preparación de los patrones	38
II-2.5 Métodos de extracción	39
II-2.5.1. Saponificación y extracción con disolvente (modificación del método utilizado por Salo-Väänänen	39
II-2.5.2. Extracción con acetona [modificación del método López y col., 2004 para la extracción de astaxantina en crustáceos]	40
II-2.6. Análisis cromatográfico	40
II-2.7. Calibración y linealidad	43
II-2.8. Límite de detección	44
II-2.9. Precisión y recuperación	44
II-2.10. Confirmación mediante HPLC-MS	44
II-2.11. Confirmación mediante HPLC-UV con "DIODE ARRAY"	45
II-3. Resultados y discusión	47
II-3.1. Métodos de extracción	47

II-3.2. Análisis cromatográfico	48
II-3.3. Análisis de muestras	51
II-4. Conclusiones	56
Bibliografía	58
III- Determinación de cenizas y minerales (calcio, fósforo y magnesio)	63
III-1. Introducción	66
III-2. Parte experimental	67
III-2.1. Material y aparatos	67
III-2.2. Reactivos	67
III-2.3. Análisis de minerales	67
III-3. Resultados y discusión	69
III-4. Conclusiones	74
Bibliografía	75
IV- Determinación de proteínas y aminoácidos	77
IV-1. Introducción	80
IV-2. Parte experimental	85
IV-2.1. Material y aparatos	85
IV-2.2. Patrones	85
IV-2.3. Reactivos	86
IV-2.4. Método directo para la determinación de proteínas	87
IV-2.4.1. Principio	88
IV-2.4.2. Digestión	89
IV-2.4.3. Destilación	89
IV-2.4.4. Blanco	90
IV-2.4.5. Valoración	90
IV-2.4.6. Determinación de nitrógeno	90
IV-2.4.7. Verificación de la determinación de nitrógeno	91
IV-2.4.7.1. Principio	91
IV-2.4.7.2. Preparación del blanco	91
IV-2.4.7.3. Digestión, destilación, blanco y valoración	91
IV-2.5. Preparación de muestras y patrones en la determinación de aminoácidos	92
IV-2.6. Derivatización con PITC	92
IV-2.7. Equipo de HPLC. Condiciones	93

IV-3. Resultados y discusión	94
IV-3.1. Contenido en proteínas	94
IV-3.2. Contenido en aminoácidos	95
IV-4. Conclusiones	101
Bibliografía	102
V- Determinación de quitina	107
V-1. Introducción	110
V-2. Parte experimental	115
V-2.1. Material y aparatos	115
V-2.2. Patrones	115
V-2.3. Reactivos	115
V-2.4. Preparación de la fase móvil	116
V-2.5. Preparación de los patrones	116
V-2.6. Hidrólisis ácida de las muestras	117
V-2.7. Condiciones cromatográficas	117
V-2.7.1. HPLC-RI	117
V-2.7.2. HPLC-MS	117
V-3. Resultados y discusión	118
V-3.1. Optimización del método cromatográfico	118
V-3.2. Optimización de la hidrólisis	119
V-3.3. Validación del método	120
V-3.4. Contenido de quitina de las muestras de cangrejo	121
V-4. Conclusiones	124
Bibliografía	125
VI- Determinación de ácidos grasos y lípidos totales	129
VI-1. Introducción	132
VI-2. Parte experimental	134
VI-2.1. Material y aparatos	134
VI-2.2. Patrones	134
VI-2.3. Reactivos	135
VI-2.4. Extracción de lípidos	135
VI-2.4.1. Extracción por Soxhlet	135
VI-2.4.2. Extracción de Bligh & Dyer modificada	136

VI-2.4.3. Extracción con fluidos supercríticos	136
VI-2.5. Análisis de ácidos grasos con GC-FID	136
VI-2.6. Análisis de ácidos grasos con GC-MS	137
VI-3. Resultados y discusión	139
VI-3.1. Lípidos totales	139
VI-3.2. Ácidos grasos	140
VI-4. Conclusiones	146
Bibliografía	147
VII- Composición nutricional	151
VII-1. Composición nutricional. Discusión general	153
VII-2. Conclusiones	165

ÍNDICE DE TABLAS

I-Introducción

Tabla I-1: Porcentaje de humedad y tamaño medio de los cangrejos analizados en el 2003	16
---	----

Tabla I-2: Porcentaje de humedad y tamaño medio de los cangrejos analizados en el 200	17
--	----

II- Determinación de vitamina E y pigmentos carotenoides

Tabla II-1: Condiciones de trabajo en HPLC-UV-FL.	41
--	----

Tabla II-2: Tiempos de retención de los analitos.	41
--	----

Tabla II-3: Parámetros de calibración.	43
---	----

Tabla II-4: Condiciones de trabajo en HPLC-MS.	44
---	----

Tabla II-5: Características estadísticas.	51
--	----

III- Determinación de cenizas y minerales (calcio, fósforo y magnesio)

Tabla III-1: Valores de cenizas y minerales.	70
---	----

Tabla III-2: Correlaciones entre cenizas, calcio y magnesio.	72
---	----

Tabla III-3: Concentraciones de macrominerales en carne y subproductos de crustáceos.	73
--	----

IV- Determinación de proteínas y aminoácidos

Tabla IV-1: Condiciones de trabajo para la separación de aminoácidos.	93
--	----

Tabla IV-2: Rectas de regresión y tiempos de retención para los diferentes aminoácidos analizados.	96
---	----

Tabla IV-3: Contenido de aminoácidos (g/100 g m.s.) de los cangrejos analizados (caparazón y contenido del caparazón individual y conjuntamente) [Media g AA/100 g muestra seca- Desviación estándar].	99
---	----

VI- Determinación de ácidos grasos y lípidos totales

Tabla VI-1: Promedio de porcentajes de ácidos grasos.	143
--	-----

Tabla VI-2: Porcentajes relativos de ácidos grasos identificados.	144
--	-----

VII- Composición nutricional

Tabla VII-1: Correlaciones entre lípidos y cenizas.	157
--	-----

Tabla VII-2: Composición proximal de caparazones de varios crustáceos.	160
---	-----

Tabla VII-3: Composición proximal de la carne de varios crustáceos.	161
--	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

I-Introducción

Figura I-1: Cangrejo de las Nieves (<i>Chionoecetes opilio</i>) (FAO, 2007).	3
Figura I-2: Vista dorsal de la hembra y macho adultos del Cangrejo de las Nieves (Plante, 2003).	5
Figura I-3: Diferencias entre macho adulto-adolescente y hembra adulta-inmadura, con sus respectivas vistas ventral y dorsal (Plante, 2003).	6
Figura I-4: Diagrama del ciclo biológico del Cangrejo de la Nieves (Plante, 2003).	8
Figura I-5: Identificación de las áreas de pesca del Cangrejo de las Nieves en el Golfo de St. Lawrence y Este de Nueva Escocia (Plante, 2003).	9
Figura I-6: Producción de la captura global del <i>Chionoecetes opilio</i> (FAO 2007).	10
Figura I-7: Mercados principales del <i>Chionoecetes opilio</i> (Fisheries and Oceans Canada, 2007).	11
Figura I-8: Tipos de trampas empleadas en la captura del <i>Chionoecetes opilio</i> (Plante, 2003).	12
Figura I-9: Tamaño y peso de las muestras capturadas en el 2003.	17
Figura I-10: Tamaño y peso de las muestras capturadas en el 2005.	18

II- Determinación de vitamina E y pigmentos carotenoides

Figura II-1: Cromatograma del patrón de vitamina E: A) Detector de fluorescencia B) Detector UV/Visible.	42
Figura II-2: Cromatograma del patrón de β -Caroteno: Detector UV/Visible.	42
Figura II-3: Cromatograma del patrón de astaxantina: Detector UV/Visible.	42
Figura II-4: Espectro 3D del patrón de astaxantina.	45
Figura II-5: Espectro 3D del patrón de β -caroteno.	46
Figura II-6: Cromatograma de una muestra extraída por saponificación A) Detector de fluorescencia. Pico 1: Vitamina E. B) Detector UV/Visible. Pico 1: Vitamina E; Pico 2: β -caroteno.	49
Figura II-7: Cromatograma de una muestra extraída con acetona: A) Detector de fluorescencia. Pico 1: Vitamina E B) Detector UV/Visible. Pico 1: Vitamina E; Pico 2: Astaxantina; Picos 3 y 5: Derivados de astaxantina. Pico 4: β -caroteno.	49
Figura II-8: Patrón de vitamina A en multiexcitación	50
Figura II-9: Patrón de vitamina A en multiemisión.	50

III- Determinación de cenizas y minerales (calcio, fósforo y magnesio)

Figura III-1: Valores de cenizas y minerales obtenidos en ambos años de muestreo.	70
Figura III-2: Relación Calcio-cenizas de las muestras analizadas en el año 2003.	71
Figura III-3: Relación Calcio-cenizas de las muestras analizadas en el año 2005.	71
Figura III-4: Relación magnesio-fósforo de las muestras analizadas en el año 2003.	71
Figura III-5: Relación magnesio-fósforo de las muestras analizadas en el año 2005.	72

IV- Determinación de proteínas y aminoácidos

Figura IV-1: Estructura general de los aminoácidos.	80
Figura IV-2: Equipo de digestión "Bloc-Digest" de J.P. Selecta.	87
Figura IV-3: Unidad de destilación "Pro-Nitro" de J.P. Selecta.	88
Figura IV-4: Cromatograma de un patrón de aminoácidos.	98
Figura IV-5: Cromatograma de aminoácidos de una muestra del cangrejo <i>Chionoecetes opilio</i> (caparazón y contenido).	98

V- Determinación de quitina

Figura V-1: Estructura molecular de la quitina (Sinónimo: Poly(<i>N</i> -acetil-1,4-β-D-glucopiranosamina); Fórmula molecular: $(C_8H_{13}NO_5)_n$; n° CAS: 1398-61-4).	110
Figura V-2: Estructura molecular del quitosano (Sinónimos: 2-Amino-2-deoxy-(1→4)-β-D-glucopyranan, quitina deacetilada, Poly-(1→4)-β-D-glucosamina, Poly-(1,4-β-D-glucopiranosamina); n° CAS: 1398-61-4).	112
Figura V-3 (A y B): Estructura molecular de la N-acetil-D-glucosamina (sinónimos: 2-Acetamido-2-deoxy-D-glucosa, D-GlcNAc; Fórmula molecular: $C_8H_{15}NO_6$; n° CAS: 7512-17-6) y de la D-glucosamina (sinónimo: 2-Amino-2-deoxy-D-glucosa; Fórmula molecular: $C_6H_{13}NO_5$).	113
Figura V-4: Espectro de masas obtenido de una muestra de cangrejo.	119
Figura V-5: Cromatograma del patrón de glucosamina (A) y de los caparazones de cangrejo por hidrólisis ácida (B).	121
Figura V-6: Cromatograma superpuesto del residuo obtenido y del patrón de quitina comercial.	122

VI- Determinación de ácidos grasos y lípidos totales

Figura VI-1: Dispositivo de extracción por Soxhlet.	135
Figura VI-2: Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos de una solución patrón [A- C14:0, B- C16:0, C- C16:1n7, D- C16:2n4, E- C18:0, F- C18:1n9, G- C18: 1n7, H- C18:2n6, I- C18:3n4, J- C18:3n3, K- C18:4n3, L- C20:0, M- C20:1n9, N- C20:2, O- C20:4n6, P- C20:3, Q- C20:4n3, R- C20:5n3, S- C22:0, T- C22:5n3, U- C22:6n3].	141

Figura VI-3: Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos de una muestra de cangrejo [A- C14:0, B- C16:0, C- C16:1n7, D- C16:2n4, E- C18:0, F- C18:1n9, G- C18: 1n7, H- C18:2n6, I- C18:3n4, J- C18:3n3, K- C18:4n3, L- C20:0, M- C20:1n9, N- C20:2, O- C20:4n6, P- C20:3, Q- C20:4n3, R- C20:5n3, S- C22:0, T- C22:5n3, U- C22:6n3].	141
Figura VI-4: Espectros de GS-MS de C:16 (A), C18:1 w9 (B) y C:20 4 w3 (C)	142
Figura VI-5: Proporción relativa de ácidos grasos del caparazón de cangrejo del <i>Chionoecetes opilio</i> .	144
VII- Composición nutricional	
Figura VII-1: Composición media del cangrejo <i>Chionoecetes opilio</i> .	153
Figura VII-2: Contenido de β-caroteno, vitamina E, Astaxantina y Ésteres de astaxantina en ambos años de estudio.	154
Figura VII-3: Comparación de datos medios de los parámetros analizados en los dos años de estudio.	155
Figura VII-4: Aminoácidos analizados en ambos años de estudio en el caparazón del <i>Chionoecetes opilio</i>	156
Figura VII-5: Contenido en lípidos y cenizas de los cangrejos del 2003.	157
Figura VII-6: Contenido en lípidos y cenizas de los cangrejos del 2005.	157
Figura VII-7: Proporción relativa de todos los ácidos grasos encontrados en las muestras.	158
Figura VII-8: Proporción relativa de ácidos grasos poliinsaturados en el cangrejo <i>Chionoecetes opilio</i>	159
Figura VII-9: Proporción relativa de ácidos grasos poliinsaturados w3 y w6.	159

ABREVIATURAS

AA	Aminoácidos
d.i.	Diámetro interno
DHA	Docosahexaenoico
EPA	Eicosapentaenoico
FAMEs	Ésteres metílicos de ácidos grasos
FAO	Food and Agriculture Organization
FID	Detector de ionización de llama
FNIC	Food and Nutrition Information Center
GC	Cromatografía de gases
GC-MS	Cromatografía de gases-Espectrometría de Masas
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
HPLC-IR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución-Índice de Refracción
HPLC-UV-VIS-FL	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución-Ultravioleta- Visible-Fluorescencia
m.s.	Muestra seca
PITC	Fenilisotiocianato
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados
r²	Coeficiente de determinación
r.p.m.	Revoluciones por minuto
TEA	Trietilamina
UV	Ultravioleta

No se incluyen las abreviaturas correspondientes al Sistema Internacional de Unidades (Decreto 1257/74, de 25 de abril de 1974, publicado en el BOE nº 110 de 08/5/1974).

I- INTRODUCCIÓN

I-1. Cangrejo de las Nieves (*Chionoecetes opilio*)

I-1.1. Características generales. Distribución y ecología

Según la resolución de 27 de febrero de 2006 de la Secretaría General de Pesca Marítima, que establece y publica el listado de denominaciones comerciales de especies pesqueras y de acuicultura admitidas en España, el nombre científico del cangrejo de las Nieves o cangrejo Rojo es "*Chionoecetes opilio*", su nombre comercial "Cangrejo de las Nieves" y su código FAO se corresponde con las letras CRQ (FAO, 2007).

El nombre común de *Chionoecetes opilio* varía según el país: Snow crab, Spider crab, Queen crab en inglés, Crabe des neiges y Crabe araignée en francés y Zuwai gani en japonés (Figura I-1).

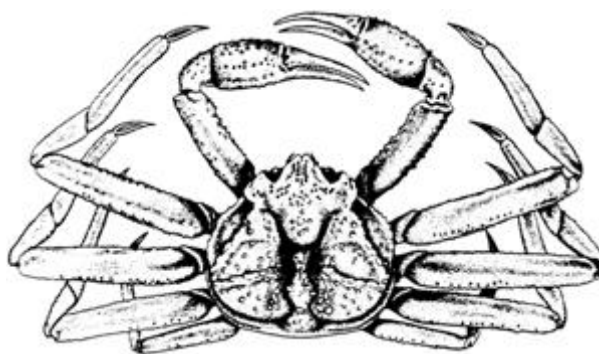


Figura I-1: Cangrejo de las Nieves (*Chionoecetes opilio*) (FAO, 2007)

Su hábitat se encuentra en diversas zonas como el noroeste del océano Atlántico (abarcando desde Groenlandia hasta el Golfo de Maine), el norte del océano Pacífico, el mar de Bering, el océano Ártico y el mar de Japón. En el océano Atlántico, *C. opilio*, es la única especie presente, mientras que en el mar de Japón y en el océano Pacífico existen cuatro especies de

Chionoecetes y dos sub-especies del mismo (Plante, 2003). *C. opilio elongatus* y *C. japonicus* se encuentran en el Mar de Japón, mientras que *C. japonicus pacificus* está presente en el pacífico Central. La distribución de *C. bairdi* se expande desde el Mar de Bering a California y *C. angulatus* desde el Mar de Bering a Oregon. *C. tanneri* se encuentra a lo largo de la costa de Columbia y los estados de Washington y Oregon.

En la zona Atlántica, viven comúnmente en fondos arenosos o barrocos, a temperaturas entre -1 y 5 °C y a profundidades que varían entre 20 y 420 m. En el Golfo de St. Lawrence, sin embargo, son más abundantes entre los 70 y los 140 m y en la costa este de Nueva Escocia, las profundidades varían entre 45 y 245 m.

La alimentación del *Chionoecetes opilio* es variada y está formada principalmente de algas, crustáceos (langostas y otros cangrejos), moluscos y gusanos.

Los cangrejos adultos son dimórficos, siendo el macho mucho más grande que la hembra. En los machos, la medida del caparazón podría alcanzar un ancho de 16.5 cm, la longitud de las patas 90 cm y un peso aproximado de 1.35 Kg. Mientras que en las hembras el ancho del caparazón podría llegar a los 9.5 cm, la longitud de las patas a 38 cm y el peso a 0.45 Kg. El abdomen de los machos tiene forma de pirámide truncada, mientras que el de las hembras tiene forma circular (Figura I-2).

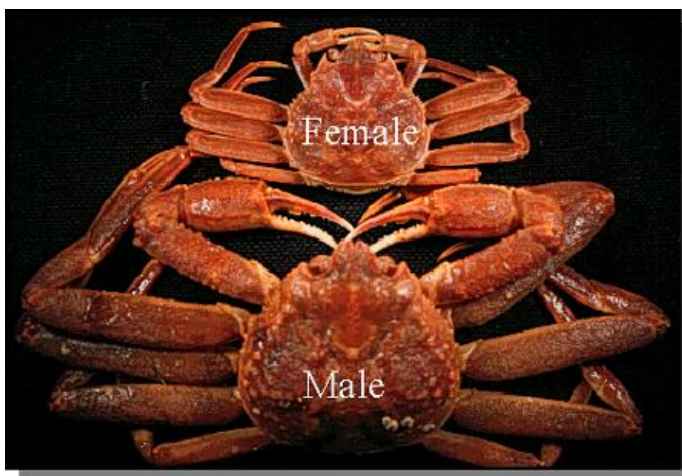


Figura I-2: Vista dorsal de la hembra y macho adultos del Cangrejo de las Nieves (Plante, 2003)

I-1.2. Ciclo biológico

A lo largo de su vida el cangrejo sufre varias mudas y pasa por diferentes etapas de desarrollo que varían también en función del sexo.

El cangrejo, construye en cada muda un nuevo caparazón bajo el antiguo. Cuando las condiciones son adecuadas el caparazón viejo se desprende y se realiza la muda. El caparazón estará inicialmente arrugado, pero en cuanto el cangrejo se mete en el agua, alcanza su nuevo tamaño en pocas horas y con el tiempo este nuevo caparazón se endurece permitiendo el crecimiento del cangrejo. En cada muda el cangrejo macho crece un 20% a lo ancho y aumenta un 60% su peso (Minister of Supply and Services, 2005).

En el Golfo de St. Lawrence, las hembras sufren su muda terminal con un ancho de caparazón de 45 a 57 mm (entre 5.5 y 6.5 años), mientras que los machos alcanzan la madurez entre 51 y 115 mm (entre 5.7 y 9.7 años). En su ciclo biológico el macho atraviesa tres etapas (Figura I-3): inmadura (sus

órganos reproductores no están desarrollados); adolescente (sus órganos reproductores son funcionales pero sus pinzas están poco diferenciadas) y adulta (sus órganos reproductores son funcionales y sus pinzas diferenciadas).

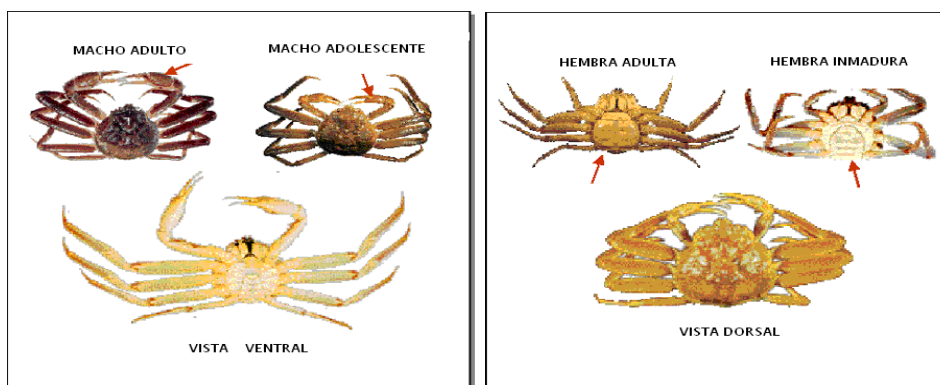


Figura I-3: Diferencias entre macho adulto-adolescente y hembra adulta-inmadura, con sus respectivas vistas ventral y dorsal (Plante, 2003).

Entre la etapa inmadura y adolescente, la etapa juvenil, el cangrejo sufre la muda de pubertad, en la cual aparece el esperma y el crecimiento de las pinzas es equiparable al del caparazón. Entre la etapa adolescente y adulta tiene lugar la muda terminal, que empieza en primavera y dura hasta el final del invierno.

En las hembras el ciclo biológico se desarrolla también en tres etapas (Figura I-3): inmadura (la hembra posee abdomen estrecho y sin ovarios aparentes); prepubescente (el abdomen sigue siendo estrecho y se forman dos ovarios que contendrán en su interior los huevos) y adulta (el abdomen es alargado y permite el transporte de los huevos, en esta etapa tiene la capacidad de reproducirse). Las hembras que se aparean después de la muda terminal y transportan su primer grupo de huevos, se llaman primíparas,

mientras que el término multíparas se usa para describir a las que transportan los huevos por segunda vez o incluso más. En el este de Canadá, las hembras del *C. opilio* mudan de diciembre a abril. La muda de maduración se considera como la muda terminal tanto para los machos como para las hembras.

En las hembras primíparas, el apareamiento se lleva a cabo inmediatamente después de la muda de madurez, normalmente de febrero a mediados de marzo. Generalmente depositan sus huevos durante las primeras 24 horas después del apareamiento. Los huevos se colocan bajo el abdomen de la hembra, donde los transporta hasta la formación de larvas, uno o dos años después, dependiendo de la temperatura del agua. El esperma restante se almacena en dos pequeños sacos llamados espermateca. Después de que las larvas se liberan, las hembras podrían aparearse de nuevo o utilizar el esperma almacenado para fertilizar sus futuros huevos sin aparearse. Dependiendo de su talla, las hembras producen entre 12.000 y 128.000 huevos. Las larvas se liberan entre abril y finales de mayo. Dependiendo de la temperatura, el desarrollo de las larvas podría durar desde los dos meses hasta los ocho (Figura I-4). Los cangrejos inmaduros mudan a juveniles, adolescentes y finalmente, cangrejos adultos (Plante, 2003).

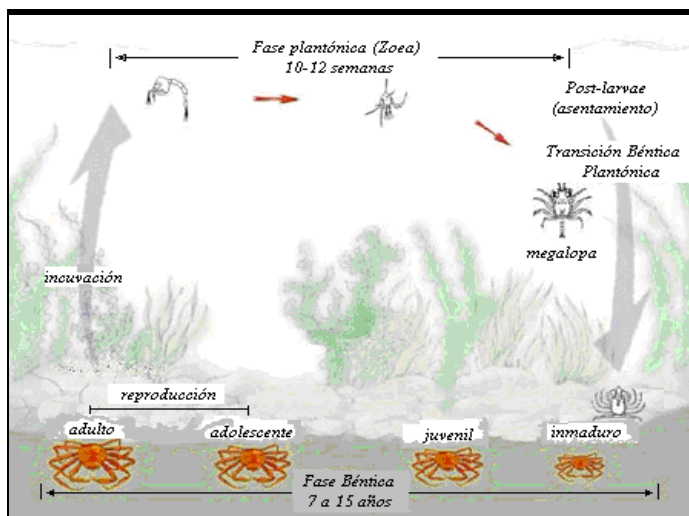


Figura I-4: Diagrama del ciclo biológico del Cangrejo de la Nieves (Plante, 2003)

El cangrejo dispone de un importante mecanismo de defensa para protegerse de sus enemigos. Posee una pequeña ranura circular que le permite desprenderse de sus patas en caso de ser apresado por algún depredador. Una válvula situada en este punto evita la pérdida de sangre, formándose rápidamente una cicatriz a partir de la cual comenzará a crecer una nueva pata en la próxima muda. Este proceso puede llevarlo a cabo hasta tres veces (Minister of Supply and Services, 2005).

I-1.3. Explotación comercial

La pesca comercial del *Chionoecetes opilio* en la zona Canadiense, comenzó en 1966, situando el mayor proveedor en el Golfo de St. Lawrence. Las capturas realizadas alcanzaron un máximo de 31.500 t en 1982 y hasta el año 1986 se mantuvieron sobre 25.000 t, sin embargo, en 1990 no llegaron a superar las 7.000. En el año 1995 las capturas rondaron las 20.000 t y han ido oscilando entre 11.500 y 16.500 t hasta el año 2000.

Se han localizado cada año nuevos proveedores. Las principales zonas de pesca se encuentran desde el sureste de la Península Gaspé (Quebec) hasta la Isla Magdalena; en la Isla Cape Breton y en el suroeste de Nueva Escocia. En determinadas zonas de Terranova existen también zonas de pesca (Figura I-5).

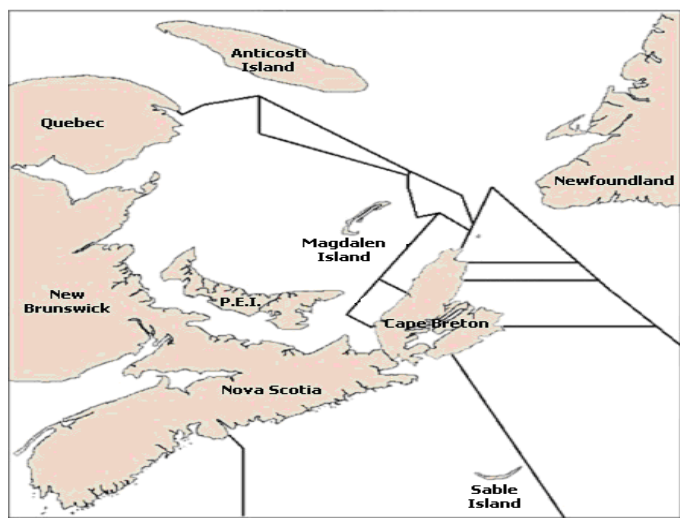


Figura I-5: Identificación de las áreas de pesca del Cangrejo de las Nieves en el Golfo de St. Lawrence y Este de Nueva Escocia (Plante, 2003)

La captura total de esta especie en el año 1999, fue de 95.704 t correspondiendo casi la totalidad a Canadá con 95.115 t (FAO, 2007) (Figura I-6). En el año 2001, las descargas en Canadá de Cangrejo de las Nieves se situaron en 95.297 t. Las capturas totales en los años 2005, 2006 y 2007 aunque menores, fueron muy similares, 49.943, 46.218 y 47.663t respectivamente, en las zonas de Terranova y Labrador (Fisheries and Oceans Canada, 2007).

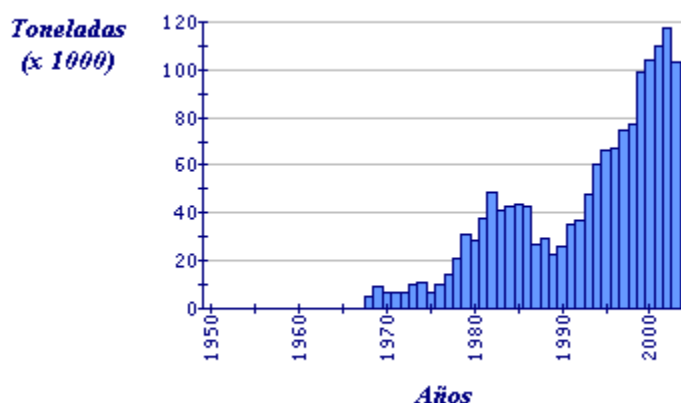


Figura I-6: Producción de la captura global del *Chionoecetes opilio* (FAO 2007)

Canadá y Québec exportan dos tercios de la captura de este cangrejo a EEUU, manteniéndose un equilibrio con Japón (Fisheries and Oceans Canada, 2003). A partir de 1996, Japón se convirtió en el destino de exportación principal desde Canadá. Sin embargo, se produjo una disminución gradual de las exportaciones como consecuencia de una disminución en la demanda del producto, aumentando así las exportaciones hacia Rusia (Fisheries and Oceans Canada, 2007).

La exportación a EEUU desde Terranova y Labrador incrementó enormemente a finales de 1990, continuando en el 2000. El mercado japonés en el 2005 contó con aproximadamente el 30 % del valor total de la exportación de estas áreas. Con respecto a Nueva Escocia (Fisheries and Oceans Canada, 2007) casi el 60 % de las exportaciones se realizaron a EEUU (Figura I-7).

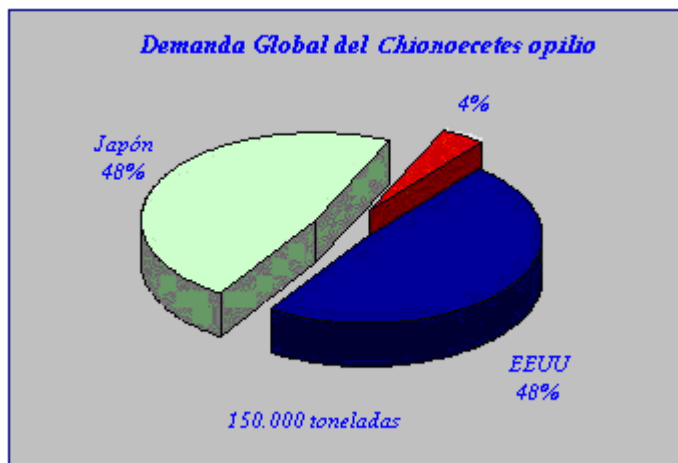


Figura I-7: Mercados principales del *Chionoecetes opilio* (Fisheries and Oceans Canada, 2007)

I-1.4. Captura y aprovechamiento

La captura de estos cangrejos se realiza mediante trampas rectangulares, piramidales o cónicas con armazón de acero y cubiertas con mallas de polipropileno (Figura I-8). Estas trampas se ceban habitualmente con arenque, caballa o calamares. Una vez capturados los cangrejos, se separan los caparazones que se tiran directamente al mar, y las patas, que es la única parte del cangrejo que se comercializa para alimentación, se almacenan en hielo en la bodega del barco. Algunas de estas embarcaciones están equipadas con un sistema circulante de agua salada que mantiene el cangrejo vivo en sus bodegas, hasta que se procesan, lo cual tiene lugar a las pocas horas después de su llegada a la fábrica (Plante, 2003).

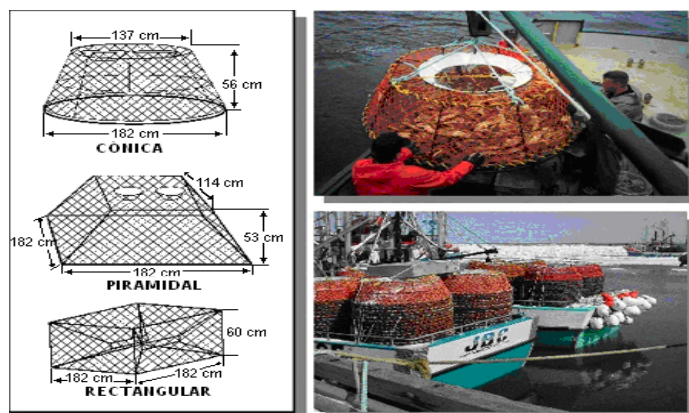


Figura I-8: Tipos de trampas empleadas en la captura del *Chionoecetes opilio* (Plante, 2003)

Las patas, única parte que se comercializa hasta el momento de estos cangrejos, se destinan mayoritariamente a los mercados de Estados Unidos y Japón (Figura I-7). El volumen de desecho de caparazones es muy alto y esta abundancia unida a su potencial valor nutritivo ha llevado a la posibilidad de rentabilizar estos subproductos, siendo considerados como una fuente potencial de nutrientes de gran interés para la fabricación de piensos para acuicultura, dado el auge actual de la misma. En este trabajo se estudia el valor nutritivo de estos caparazones, y su posible aprovechamiento en este campo.

I-2. Subproductos de pesca

Como se recoge en la memoria del proyecto en el que se incluye este estudio (<http://www.Roxocanval.org/>), el término subproducto de la pesca aplicado coloquialmente a todas aquellas partes de la morfología de los animales marinos no aprovechables directamente en la elaboración de alimentos destinados al consumo humano es, sin duda, un término intrínsecamente despectivo y erróneo. Hoy día se habla de la necesidad de aprovechar y rentabilizar lo que generan dichos subproductos: cientos de

toneladas de vísceras, cabezas y otras partes anatómicas obtenidas de la manipulación a bordo de distintas especies comerciales y que son desechadas y tiradas al mar. Según los datos de Álvarez Aranguiz (2006), el 29,5% de la producción pesquera se destina a harinas y, del resto, el 50% se convierte en desperdicios.

Si bien no todos estos "subproductos" pueden ser aprovechados en alimentación humana, lo cierto es que encierran propiedades sumamente aprovechables para otros sectores como puedan ser el cosmético, el farmacéutico y el de la alimentación animal, más en concreto, el de la acuicultura.

La dificultad del aprovechamiento de estos subproductos, radica en muchos casos en aspectos tales como la carencia de tecnología adecuada o la ocupación de la capacidad de almacenamiento frigorífico del buque; problemas que no se dan en el caso del *Chionoecetes opilio* (cangrejo Rojo), por capturarse cerca de la costa y poder almacenarse una vez llegado a puerto.

Por tratarse de un crustáceo, el valor nutritivo del Cangrejo de las Nieves es elevado. Proporciona proteínas de origen animal, y por tanto aminoácidos esenciales. En lo que a la composición lipídica se refiere, los ácidos grasos más abundantes en los crustáceos son los poliinsaturados y dentro de éstos los ω -3.

Los minerales, especialmente calcio y fósforo son componentes esenciales del cartílago y del exoesqueleto de crustáceos.

Con relación a las vitaminas son de especial interés las que tienen actividad antioxidante, E, A, y provitamina A (carotenoides).

El característico color rojo de los crustáceos marinos es proporcionado por pigmentos carotenoides como la astaxantina (Álvarez Aranguiz, 2006). Determinados peces como los salmones y las truchas no pueden sintetizar la astaxantina, sólo pueden obtenerla a través de la alimentación que reciben en el medio marino, por tanto cuando se cultivan en acuicultura es necesario aportarles dicho pigmento para evitar la falta de pigmentación en su carne, lo que puede encarecer de forma importante su producción.

La quitina y el quitosano son materiales orgánicos con una gran variedad de aplicaciones.

En los últimos años el agotamiento por sobreexplotación de los recursos marinos existentes en los distintos caladeros del mundo, inclusive aquellos que están regulados internacionalmente vía FAO a través de las Zonas Regionales de Pesca (Regional Fishery Bodies), es un hecho que está llevando a un paulatino declive a áreas de pesca tradicionales. Un porcentaje muy alto de capturas no se considera útil porque constituye una pérdida de la reserva de la biomasa o porque no son comerciales. No obstante, estas capturas pueden tener un valor nutritivo intrínseco.

El rango de especies susceptibles de ser cultivadas es cada vez mayor, por lo que también aumenta el grado de producción, de ahí la necesidad de disponer de materias primas adecuadas para la elaboración de piensos destinados a la acuicultura. La alimentación de peces y crustáceos se ha convertido en una de las áreas de investigación y desarrollo más importantes dentro de la acuicultura, además de los requerimientos nutricionales: proteínas, lípidos, hidratos de carbono, vitaminas y minerales, en las dietas destinadas a acuicultura, se añaden pigmentos carotenoides, de

origen sintético, con el fin de mejorar las características organolépticas, aumentando así su valor comercial, y consiguiendo un efecto antioxidante (Álvarez Aranguiz, 2006).

El éxito en acuicultura se basa en varios criterios como la selección del alimento adecuado y su uso. Los invertebrados marinos se están utilizando ampliamente como alimento y suplemento del mismo en todo el mundo. Se considera que los cangrejos, entre otros muchos invertebrados, son un producto de pesca importante teniendo en cuenta su caparazón. El procesado de desechos de crustáceos o de sus derivados, se ha añadido tradicionalmente a alimentos animales. Estos derivados - que contienen pigmentos, vitaminas, calcio y otros minerales, así como proteínas y aminoácidos de elevada calidad - también pueden usarse para crear productos de valor añadido (Shahidi y Synowiecki, 1991; Skonberg y col, 2001; Heu y col, 2003; Murphy y col, 2003; Toppe y col, 2006; Velu y Munuswamy, 2007).

Entre la materia prima animal actualmente desaprovechada, se encuentra el cefalotórax del Cangrejo Rojo (*Chionoecetes opilio*: Brachyura: Majidae), crustáceo sujeto a pesquerías controladas por la FAO, que se alimenta de algas, crustáceos y moluscos, y que, aportaría todos los nutrientes necesarios en acuicultura, motivo por el que podría sin duda pasar a ser una fuente animal utilizada en la elaboración de piensos destinados a la acuicultura.

I-3. Muestras (captura y preparación)

Se han analizado muestras de cefalotórax de Cangrejo Rojo, procedentes del Atlántico Norte entre Groenlandia y Canadá, 30 capturadas

en octubre del año 2003 (LAT 65 40N LONG 54 30 W) y 40 en noviembre de 2005 (LAT 63 45N LONG 053 04W).

Una vez capturados los cangrejos, el caparazón es separado manualmente y desechado, mientras que el resto del cuerpo y las patas se dedica a la venta para su consumo. Para la realización de este estudio, los caparazones se congelaron en el propio barco y se transfirieron posteriormente a nuestro laboratorio donde fueron descongelados.

Se ha hecho la valoración de las características organolépticas (tamaño, peso en húmedo y peso en seco) en las muestras, previamente descongeladas para su análisis (Tablas I-1 y I-2, Figuras I-9 y I-10).

Peso húmedo	116.4±30
% Humedad	74.7±5.5
Tamaño:	
Ancho	11.3±0.9
Largo	11.8±0.9

Tabla I-1: Porcentaje de humedad y tamaño medio de los cangrejos analizados en el 2003

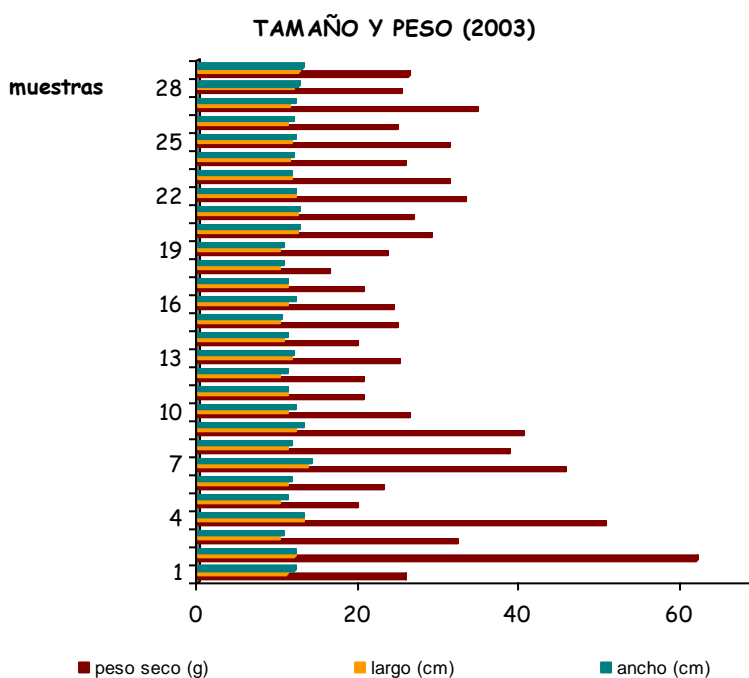


Figura I-9: Tamaño y peso de las muestras capturadas en el 2003

Peso húmedo	130,8±22,9
% Humedad	70±5,3
Tamaño:	
Ancho	12,4±1,0
Largo	11,1±1,0

Tabla I-2: Porcentaje de humedad y tamaño medio de los cangrejos analizados en el 2005

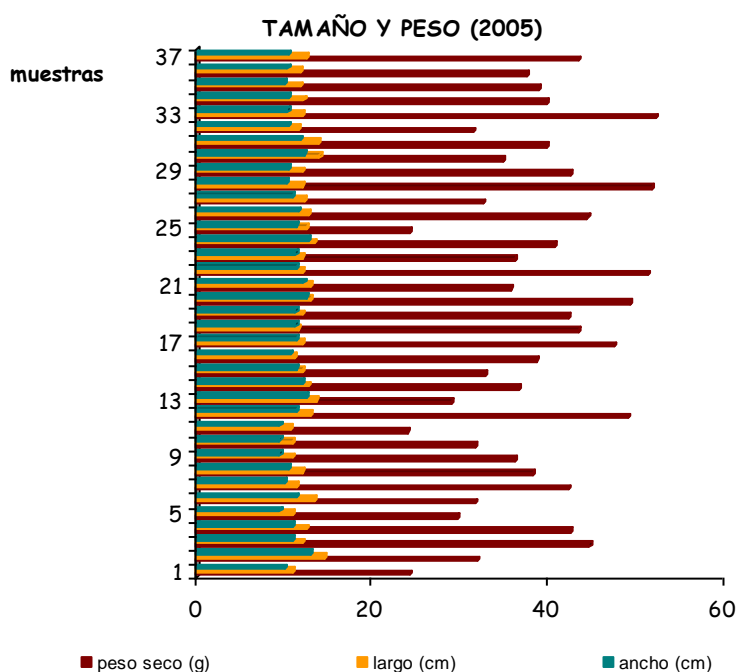


Figura I-10: Tamaño y peso de las muestras capturadas en el 2005

La preparación de las muestras en el año 2003 se hizo a vacío y 55 °C, después de la descongelación y evaporación del agua de la muestra a Baño María. En las del 2005 se hizo a 100 °C en estufa de aire, con el fin de observar la posible influencia de la temperatura en algunos de los parámetros analizados.

La muestra una vez seca, se somete a triturado y homogeneización, se envasa en frascos topacio y se mantiene a temperatura de refrigeración.

Se puede observar que los cangrejos del año 2003 son en general, más pequeños que los recogidos en 2005 y con menor contenido de carne residual en el caparazón.

En el primer año de estudio las proteínas se determinaron en los caparazones y en el caldo de los mismos por separado, mientras que en el segundo año se realizó conjuntamente. No se observaron diferencias significativas.

Las cenizas se han determinado por incineración hasta la obtención de cenizas grises. El primer año se hicieron sólo en caparazón, mientras que en el segundo año se hicieron conjuntamente con el contenido, ya que se consideró necesario debido a la cantidad de caldo que presentaban estas últimas muestras. Sin embargo los resultados finales de cenizas no variaron mucho entre ambos años de estudio.

Para el resto de los componentes analizados tampoco hubo diferencias significativas entre los dos años de estudio, salvo en los resultados de vitaminas, como consecuencia de la influencia de la temperatura utilizada en el tratamiento de las muestras, y en el contenido de lípidos totales, debido a una mayor presencia de residuo graso en los caparazones en el segundo año. En el capítulo VII se detallan los resultados obtenidos en cada año de muestreo.

I-4. OBJETIVOS

El aprovechamiento de un "subproducto" de origen marino (cefalotórax del cangrejo de las Nieves o cangrejo Rojo), como materia prima destinada a la elaboración de piensos utilizados en acuicultura, fruto de la manipulación de buques de pesca congeladores cuyo tonelaje está sujeto a controles de la FAO, supondría un recurso sostenible en el tiempo. Ello representaría además, una rentabilidad adicional para las empresas armadoras dedicadas a la explotación de esta especie (Álvarez Aranguiz, 2006).

En este trabajo se lleva a cabo la optimización, validación y aplicación de métodos analíticos para el estudio de los nutrientes presentes en el caparazón de *Chionoecetes opilio*, tales como carotenoides, vitamina E, cenizas, elementos minerales, proteínas, aminoácidos proteinogénicos, quitina, lípidos y ácidos grasos, con el fin de conocer su valor nutritivo y la posibilidad de ser utilizado para la formulación de dietas destinadas a distintas especies acuícolas cultivadas.

- Puesta a punto de métodos analíticos y validación de los mismos en muestras de cangrejo. La metodología a seguir es:
 - ❖ Extracción y/o separación. Teniendo en cuenta la naturaleza de las muestras se hace un estudio de las técnicas de extracción más adecuadas para cada uno de los parámetros a analizar.
 - ❖ Purificación y concentración. Se realizarán en aquellos casos en que sea necesario.

- ❖ **Análisis.** Una vez extraídos los componentes se establecen los eluyentes, columnas cromatográficas y sistemas de detección más idóneos para la correcta separación y cuantificación de cada uno de los componentes. (Estudio de la precisión, recuperación, límite de detección, linealidad).
- **Parámetros analizados**
 - ❖ Evaluación del contenido en agua.
 - ❖ Determinación de vitamina E y de carotenoides mediante HPLC-VIS -FL.
 - ❖ Determinación del contenido en proteínas, así como los aminoácidos proteinogénicos, unidades estructurales de las proteínas, determinantes de la calidad de las mismas, mediante HPLC tras una derivatización previa de la muestra.
 - ❖ Estudio de lípidos. Determinación de lípidos totales y, perfil en ácidos grasos: saturados, monoinsaturados y poliinsaturados ($\omega 3$ y $\omega 6$) mediante GC.
 - ❖ Evaluación del contenido en cenizas, así como los elementos mayoritarios de mayor interés nutricional, calcio, fósforo y magnesio.
 - ❖ Identificación y cuantificación de quitina utilizando HPLC -IR, tras una hidrólisis previa.
- **Muestreo**

Una vez elegido el método más idóneo se efectuará el análisis de las muestras por duplicado. El muestreo se repetirá al año siguiente para poder establecer posibles fluctuaciones en la composición.

- **Interpretación y valoración de los resultados obtenidos.**

La nutrición de peces y crustáceos se ha convertido en una de las áreas de investigación y desarrollo más importantes dentro de la acuicultura. Dicha nutrición, generalmente constituye una de las fracciones más relevantes dentro del presupuesto de las empresas del sector, siendo de gran importancia los requerimientos nutricionales de proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas, minerales y pigmentos carotenoides; con el fin de mejorar las características organolépticas (producir un incremento de la pigmentación de la carne) y conseguir un efecto antioxidante, aumentando así su valor comercial.

La presente tesis se ha dividido en 7 capítulos para el estudio de los componentes nutritivos: vitaminas, minerales (calcio, fósforo y magnesio), proteínas, aminoácidos, quitina, ácidos grasos y lípidos totales, en caparazones del Cangrejo de las Nieves (*Chionoecetes opilio*), con la finalidad de establecer la composición nutricional de dicho cangrejo y estudiar su posible utilización como materia prima en piensos destinados a acuicultura.

Los resultados del presente estudio han sido objeto de una serie de artículos publicados en revistas internacionales y comunicaciones a congresos internacionales.

Artículos en revistas:

1. "Protein and amino acid contents in the crab, *Chionoecetes opilio*". Food Chemistry (2007) 103 (4), 1330-1336.
2. "High-performance liquid chromatographic determination of chitin in the snow crab, *Chionoecetes opilio*". Journal Chromatography A, 1116 (2006) 189-192.
3. "Determination of vitamin E and carotenoid pigments by high performance liquid chromatography in shell of *Chionoecetes opilio*". Aceptado para su publicación el 4 de marzo de 2008 en Analytica Chimica Acta.

Comunicaciones a congresos:

1. "High-performance liquid chromatographic determination of chitin in the snow crab, *Chionoecetes opilio*". Ninth International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography Hyphenated Chromatographic Analyzers (HTC-9) and Eighth International Symposium on Advances in Extraction Techniques, York, England, February 6-10, 2006.
2. "Fatty acid profile and total lipid content in *Chionoecetes opilio* samples". 3rd International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, Prague, Czech Republic, November 7-9, 2007.
3. "Determination of vitamin E and carotenoid pigments by high performance liquid chromatography in shell of *Chionoecetes opilio*". 3rd International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, Prague, Czech Republic, November 7-9, 2007.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Álvarez Aránguiz, A. (2006). Informe sobre el aprovechamiento del Cefalotórax de Cangrejo Rojo como ingrediente de dietas para especies acuáticas (<http://www.roxocanval.org/Doc/CangrejoRojo.pdf>).

FAO (2007)

[Available:<http://www.fao.org/fi/website/FIRetrieveAction.do?dom=species&fid=2644>].

Fisheries and Oceans Canada (2003).

[Available:

http://www.dfo_mpo.gc.ca/media/backgrou/2003/snowcrab_e.htm].

Fisheries and Oceans Canada (2007).

[Available:http://www.dfo_mpo.gc.ca/fm2007gp/snowcrabcrabedesneiges2j3klno3ps4r3pn_e.htm].

Heu, M.; Kim, J.; Shahidi, F. (2003). Components and nutritional quality of shrimp processing by-products. *Food Chemistry*, 82: 235-242.

Minister of Supply and Services (2005). Marine Institute of Memorial University of Newfoundland, 2005 [Available: www.mi.mum.ca/mi-net/fishdeve/crab.htm].

Murphy, M.G.; Skonberg, D.L.; Camire, M.E.; Dougherty, M.P.; Bayer, R.C.; Briggs, J.L. (2003). Chemical composition and physical properties of

extruded snacks containing crab-processing by-product. Journal of the Science of Food Agriculture, 83: 1163-1167.

Plante, F. Snow Crab. Department of Fisheries and Oceans Canada, Snow Crab Section, 343 Université Ave / P.O. Box 5030, Moncton, New Brunswick, Canada. Date published December 2001. Last updated September 2003. [Available: <http://www.glf.dfo-mpo.gc.ca/sci-sci/crab-crab/bio-bio-e.html>].

Resolución de 27 de febrero de 2006 del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, establece el listado de denominaciones comerciales de especies pesqueras y de acuicultura admitidas en España. BOE 22 de marzo de 2006. Secretaría General de Pesca Marítima-Unión Europea..

Shahidi, F.; Synowiecki, J. (1991). Isolation and characterization of nutrients and value-added products from Snow crab (*Chionoecetes opilio*) and Shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. Journal Agricultural and Food Chemistry, 39: 1527-1532.

Skonberg, D.I.; Donahue, D.W.; Bayer, R.C.; Floreto, E.; Riley, J.G. (2001). Quality evaluation of American lobster fed diets containing processing waste. Journal of Aquatic Food Product Technology, 10: 17-29.

Toppe, J.; Aksnes, A.; Hope, B.; Albrektsen, S. (2006). Inclusion of fish bone and crab by-products in diets for Atlantic cod, *Gadus morhua*. Aquaculture, 53: 636-645.

Velu, C.S.; Munuswamy, N. (2007). Composition and nutritional efficacy of adult fairy shrimp *Streptocephalus dichotomus* as live feed. Food Chemistry, 100: 1435-1442.

II- DETERMINACIÓN DE VITAMINA E Y PIGMENTOS CAROTENOIDES

Parte de este capítulo ha sido aceptado para su publicación en *Analytica chimica Acta* (2008): "Determination of vitamin E and carotenoid pigments by high performance liquid chromatography in shell of *Chionoecetes opilio*". M. Vilasoa-Martínez; A. Rodríguez-Bernaldo de Quirós; C. Calaza-Ramos; J. López-Hernández; M.A. Lage-Yusty; P. Paseiro Losada.

Trabajo presentado como póster en:

* 3rd International Symposium on Recent Advances in Food Analysis". Prague, Czech Republic, November 7-9, 2007.

RESUMEN

En este estudio, se determina la presencia de vitamina E y pigmentos carotenoides mediante HPLC, en caparazones de *Chionoecetes opilio*. Se compararon dos métodos de extracción, saponificación y extracción simple con acetona. El último método fue seleccionado porque permite la identificación y cuantificación de la astaxantina y sus derivados, mientras que estos compuestos son degradados por el calor en el método de saponificación.

Se ha optimizado un método de HPLC con detectores en serie de fluorescencia y de UV-VIS para la determinación de vitamina E y de carotenoides. La vitamina E se determinó por medio del detector de fluorescencia (288-331 nm), mientras que el β -caroteno, la astaxantina libre y sus derivados se identificaron con el detector diode-array a 450 nm. HPLC-MS se ha utilizado para la confirmación.

En la calibración lineal de vitamina E, β -caroteno y astaxantina se obtuvieron valores de coeficiente de determinación superiores a 0,996. La precisión y la recuperación obtenidas fueron aceptables en todos los casos.

En el primer año de estudio se han analizado 30 muestras de caparazón de cangrejo, los resultados más elevados corresponden a la vitamina E (23.3 mg/100 g de m.s.), seguidos de la astaxantina total (9.49 mg/100 g de m.s.) y los más bajos para el β - caroteno (0.2 mg/100 g de m.s.).

En el segundo año se analizaron 40 muestras, obteniéndose valores de 7.94; 0.014; 0.29 y 0.48 mg/100 g de m.s. para la vitamina E, astaxantina libre, ésteres de astaxantina y β -caroteno, respectivamente.

La rápida expansión de las piscifactorías está exigiendo un suministro adecuado de alimentos para peces eficaz, nutritivo y barato. La presencia de vitamina E, astaxantina y β - caroteno indica, en el *Chionoecetes opilio*, la conveniencia del uso de esta fuente, actualmente desechada, con ventajas

económicas y un elevado valor nutritivo, para la elaboración de piensos en acuicultura.

II-1. INTRODUCCIÓN

El éxito de la acuicultura está basado en varios criterios, entre los que destaca la selección de los nutrientes adecuados y su uso, ya que contribuye favorablemente al costo de la producción de los peces. Crustáceos, como las gambas o los cangrejos son una buena fuente de nutrientes (Shahidi y Synowiecki, 1991; Rosa y Nunes, 2003; Naczek y col., 2004; Oliveira y col., 2007; Velu y Munuswamy, 2007). En este trabajo se estudia el contenido de vitamina E y de pigmentos carotenoides en el caparazón del Cangrejo de las Nieves, con la finalidad de su posterior utilización en la formulación de alimentos en acuicultura.

Los carotenoides y la vitamina E se distribuyen ampliamente en la naturaleza y están presentes en muchas plantas, algas, micro-organismos y animales. La trazabilidad de los carotenoides en los animales refleja la presencia de sus fuentes a lo largo de la cadena alimenticia. Animales acuáticos como los crustáceos, contienen varios tipos de carotenoides y se consideran como una de las fuentes naturales más importantes de los mismos (Sachindra y col., 2006), y son en muchos casos responsables de las características organolépticas consideradas por el consumidor (color brillante en la langosta, gamba, salmón...). Los carotenoides y la vitamina E inicialmente se incorporaron a los alimentos para incrementar su producción y calidad. Sin embargo, actualmente se utilizan para mejorar el color, importante en determinadas especies, como la gamba o el salmón (Lawrence y col., 2002).

Los carotenoides y la vitamina E juegan un papel destacado protegiendo a las células contra la oxidación fotosensible. Los crustáceos

pertenecen a la clase de animales marinos en los que se pueden oxidar los carotenoides (Liñán-Cabello y col., 2002; Moretti y col., 2006).

En acuicultura y piscifactorías, la astaxantina es principalmente utilizada para la pigmentación, incluyéndose normalmente en el alimento como un producto sintético. Sin embargo, otras fuentes dietéticas naturales como gambas o desechos de cangrejo de río también están disponibles en el mercado. La astaxantina es un aditivo habitual en la alimentación de peces (E161j).

La vitamina E puede utilizarse en piensos para todas las especies o categorías de animales, no se establecen límites máximo y mínimo con relación a su cantidad dentro de la composición de piensos y el período de autorización para su uso es ilimitado (Comunicación 2004/C 50/01).

Métodos fiables, sensibles y rápidos para la determinación de vitaminas en alimentos animales son esenciales para la investigación en nutrición, así como para la industria alimentaria y animal. La complejidad de la determinación simultánea de vitaminas liposolubles en los alimentos animales es debida a su inestabilidad durante la extracción, así como por las diferentes características espectrales para el análisis.

Diferentes autores han llevado a cabo varios estudios sobre la presencia e importancia de carotenoides y vitamina E en gambas, langostas y peces. El análisis de los componentes extraídos se realizó en la mayoría de los casos por HPLC (Shahidi y Synowiecki, 1991; Guillou y col., 1993; Qian y Sheng, 1998; Salo-Väänänen y col., 2000; Naczki y col., 2004; Lin y col., 2005; Nageswara y col., 2005; Sachindra y col., 2005; Barclay y col., 2006; Moretti y col., 2006; Sachindra y col., 2006; Velu y Munuswamy, 2007).

II-2. PARTE EXPERIMENTAL

II-2.1. Material y aparatos

- ❖ Cromatógrafo de líquidos HP 1100 (Hewlett-Packard, CA, USA) equipado con bomba cuaternaria, loop de inyección de 20µl (Rheodyne, Cotati, CA) y desgasificador. Detectores conectados en serie: detector de fluorescencia y detector ultravioleta con "diode array" de longitud de onda variable. Software HP ChemStation®. Columna ODS2 Teknochroma, de 25 cm x 0.4 cm de d.i. y 5 µm de tamaño de partícula. Termostatizador Spectra-Physics, modelo SP8792.
- ❖ Cromatógrafo de líquidos equipado con bomba binaria (Termo Separations Products), loop de inyección de 50µl Rheodyne. Detector de masas VG Platform (Fisons Instruments) y software VG Mass Lynx, ver. 2.0. Columna NH2 Teknokroma Tracer Extrasil de 25 cm x 0.4 cm i.d. y 5 µm de tamaño de partícula.
- ❖ Filtros MFS-13, membrana PTFE (Tamaño de poro 0,5 µm, diámetro 25 mm). ADVANTEC MFS/Inc.
- ❖ Balanza analítica, Salter-And-200, con cuatro decimales de precisión.
- ❖ Estufa eléctrica, Heraeus Hanau T 340.
- ❖ Baño termostatzado, Selecta (nº43260, modelo 141).
- ❖ Molinillo, Taurus.
- ❖ Autovortex SA6, Stuart Scientific.
- ❖ Rotavapor, Selecta Tectron 3473100.
- ❖ Otro material de uso frecuente en el laboratorio.

II-2.2. Patrones

Sigma-Aldrich S.A.:

- Astaxantina, mínimo 98%.

- Trans- β -caroteno tipo I, sintético.

Fluka, Biochemica:

- (\pm)- α -Tocoferol.

II-2.3. Reactivos

- ❖ Acetona para análisis. MERCK.
- ❖ Acetonitrilo para cromatografía líquida. MERCK.
- ❖ Ácido Ascórbico. SIGMA-ALDRICH.
- ❖ Cloruro sódico. PANREAC.
- ❖ Diclorometano para cromatografía líquida. MERCK.
- ❖ Etanol absoluto para análisis. MERCK.
- ❖ Etilo Acetato para análisis. MERCK.
- ❖ Hexano para cromatografía líquida. MERCK.
- ❖ Hidróxido de potasio, lentejas para análisis. MERCK.
- ❖ Metanol para cromatografía líquida. MERCK.
- ❖ Sulfato sódico anhidro para análisis orgánicos traza. MERCK.
- ❖ Gases de la Sociedad Española de Oxígeno: Nitrógeno seco y Helio N-50.

II-2.4. Preparación de los patrones

Las soluciones patrón de 1 mg/l de vitamina E, β -caroteno y astaxantina, se prepararon en metanol-hexano-diclorometano (50:25:25). Estas soluciones se utilizaron posteriormente para preparar las soluciones de trabajo.

II-2.5. Métodos de extracción

Se compararon dos métodos de extracción, en el primero se llevó a cabo una saponificación y posterior extracción con disolventes y en el segundo una extracción simple con acetona.

II-2.5.1. Saponificación y extracción con disolvente [modificación del método utilizado por Salo-Väänänen (Salo-Väänänen y col., 2000)].

Se agregan 10 ml de etanol y 5 ml de ácido ascórbico al 2% a 1 g de muestra seca, agitándolo posteriormente en el vortex durante algunos segundos para mezclarlos. Se añaden 4 ml de KOH 100% (p/p), se cierra el tubo creando previamente atmósfera de nitrógeno y se vuelve a agitar.

Se lleva la mezcla a un baño termostatzado a 100 °C durante 20 minutos y se introduce la muestra en un baño de hielo 10 minutos más.

Una vez terminada la saponificación, se procede a la extracción mediante disolventes. Para ello se añaden 10 ml de cloruro sódico al 10% (p/v) y se agita en el vortex, se añaden 20 ml de hexano-etilacetato (80:20) y se agita de nuevo. A continuación se recoge la fase orgánica y se repite dos veces este procedimiento.

Se reúnen los extractos orgánicos y se añaden 20 ml de cloruro sódico al 5% (p/v), recogiendo la fase orgánica de nuevo. Se añade sulfato sódico anhidro y se decanta la fase orgánica. Se filtra mediante un filtro de membrana de 0,5 μm a un balón y se evapora a sequedad en rota-vapor a 35°C.

El residuo obtenido se redisuelve en 1 ml de metanol-hexano-diclorometano (50:25:25), y la muestra está preparada para el análisis cromatográfico.

II-2.5.2. Extracción con acetona (modificación del método López y col., 2004 para la extracción de astaxantina en crustáceos).

Se le añaden a 1g de la muestra seca 5 ml de acetona, se agita en un vortex y se recoge el extracto de acetona obtenido, repitiendo dos veces este procedimiento.

A continuación se llevan los extractos a un matraz de 25 ml, se enrasa y se filtra con un filtro de membrana de 0,5 μ m. El filtrado obtenido se evapora a sequedad en rotavapor, a temperatura de 35 °C. El residuo se redisuelve con 1ml de metanol-hexano-diclorometano (50:25:25).

Este método de extracción es el elegido para llevar a cabo los análisis de las muestras.

II-2.6. Análisis Cromatográfico

HPLC-UV-VIS-FL

Las longitudes de onda utilizadas con el detector de Fluorescencia fueron 280 nm para excitación y 331 nm para emisión para la vitamina E. Con el detector UV-Vis se utilizó la longitud de onda de 215 nm para la vitamina E y la de 450 nm para la astaxantina y β - caroteno. La fase móvil metanol, acetonitrilo y hexano-diclorometano (50:50) se utilizó en gradiente y el rango del flujo entre 0.8 ml/min y 2 ml/min (Tabla II-1).

La identificación de los picos se basó en la comparación de los tiempos de retención (Tabla II-2) (Fig. II-1, II-2 y II-3) y en los espectros obtenidos en el momento real de análisis mediante el diode-array, para el análisis de los patrones.

La temperatura de la columna se mantuvo a 30 °C.

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	% Metanol	%Acetonitrilo	% Hexano- Diclorometano
0	0.8	15	75	10
7	0.8	45	45	10
16	1.0	15	40	45
20	1.2	15	40	45
21	2.0	15	75	10
45	2.0	15	75	10

Tabla II-1: Condiciones de trabajo en HPLC-UV-FL.

Analitos	Tiempos de retención (min)
Astaxantina	3.5
Vitamina E	9
β -Caroteno	14.5
Derivados de Astaxantina	12 y 15.5

Tabla II-2: Tiempos de retención de los analitos.

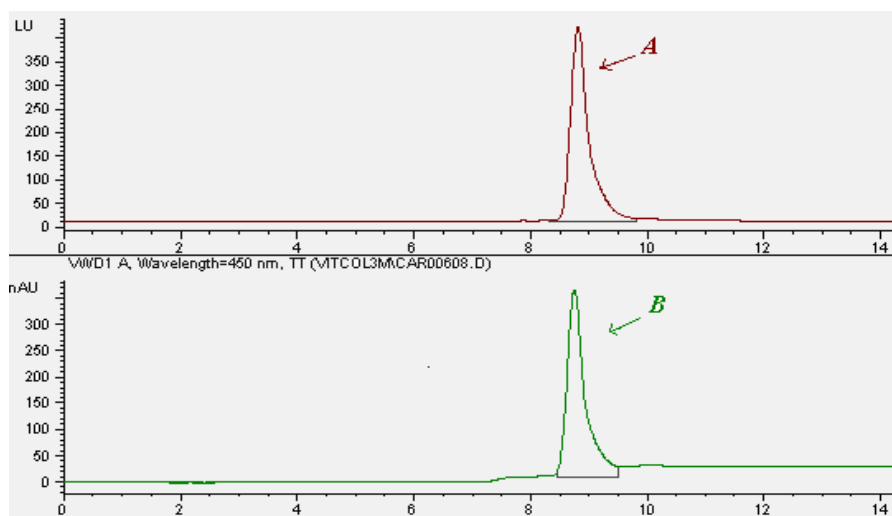


Figura II-1: Cromatograma del patrón de vitamina E: A) Detector de fluorescencia B) Detector UV/Visible.

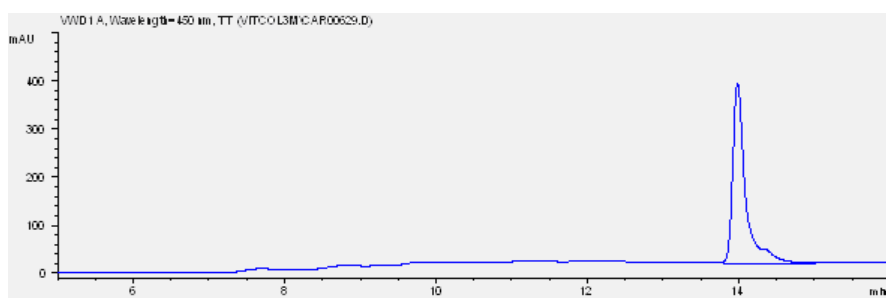


Figura II-2: Cromatograma del patrón de β -Caroteno: Detector UV/Visible.

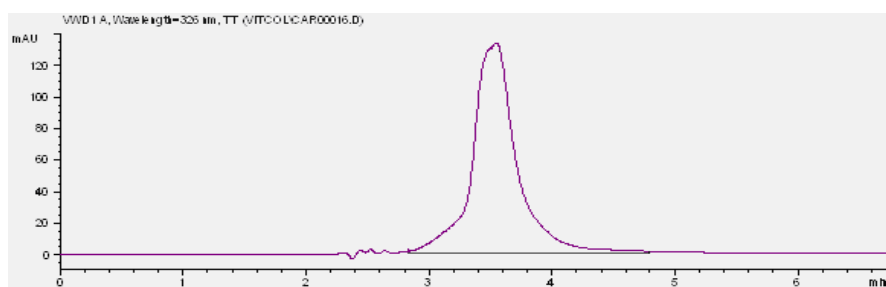


Figura II-3: Cromatograma del patrón de astaxantina: Detector UV/Visible.

II-2.7. Calibración y linealidad

La calibración del método se estableció mediante rectas de calibrado realizadas con los patrones de cada uno de los compuestos en metanol-hexano-diclorometano (50:25:25), en un rango de concentraciones adecuado en función de los resultados esperados en las muestras. Las rectas de calibrado se calcularon por regresión de la media ($n=3$) del área del pico y la concentración del patrón. Los rangos de concentración utilizados fueron: 50-400 $\mu\text{g/ml}$ para la vitamina E, 1-20 $\mu\text{g/ml}$ para β -caroteno y 5-500 $\mu\text{g/ml}$ para la astaxantina en el año 2003 (Tabla II-3).

En el segundo año los parámetros de calibración obtenidos para la vitamina E y β -caroteno fueron similares. Para la astaxantina, debido a la baja concentración encontrada en el año 2005, se realizó una nueva recta de calibrado en un rango de 0.1-0.6 $\mu\text{g/ml}$.

Parámetros de calibración lineales	Vitamina E	β -caroteno	Astaxantina
AÑO 2003			
Intersección	718.5	50.95	-636.2
Pendiente	43.27	449.5	149.5
Coefficiente de determinación	0.9969	0.9993	0.9998
Rango ($\mu\text{g/ml}$)	50.81-406.8	1.014-20.28	5.0-500.0
Límites de detección ($\mu\text{g/ml}$)	0.13	0.025	0.01
Precisión (RSD %)	2.40	5.07	6.00
Recuperación (%)	99.69	97.21	104.5

Tabla II-3: Parámetros de calibración.

II-2.8. Límite de detección

El límite de detección, señal que es tres veces la altura del nivel del ruido, se estableció de acuerdo con la Sociedad Química Americana (ACS) (Tabla II-3).

II-2.9. Precisión y recuperación

La precisión se determinó aplicando el procedimiento a seis alícuotas de una muestra preparada a partir de la mezcla homogénea de varios cangrejos. Se extraen con acetona y el residuo redissuelto en metanol:hexano:diclorometano (50:25:25) se inyecta en el cromatógrafo (Tabla II-3).

Para el cálculo de la recuperación, 1 g de muestra se sobrecarga con cantidades similares a las encontradas en las muestras y se someten al método de análisis (Tabla II-3).

II-2.10. Confirmación mediante HPLC-MS

La fase móvil en HPLC-MS utilizada en gradiente fue metanol-acetonitrilo (14:86) y hexano-diclorometano (50:50), con un rango de flujo entre 0.8 y 1.2 ml/min (Tabla II-4).

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	%Metanol-Acetonitrilo (14:86)	%Hexano-Diclorometano (50:50)
0	0.8	90	10
7	0.8	90	10
16	1.0	55	45
24	1.2	55	45
25	0.8	90	10

Tabla II-4: Condiciones de trabajo en HPLC-MS.

Las condiciones de trabajo del detector de masas fueron las siguientes: ionización química en modo positivo a presión atmosférica (APCI+), temperatura de la sonda 450 °C, voltaje del cono (+) 20 V, caudal del nitrógeno 425 l/h, caudal del nitrógeno en la sonda de APCI 175 l/h.

Para la confirmación se utilizó el modo de adquisición SIM y los iones monitorizados fueron los siguientes: m/z, 430 para el α -tocoferol (fragmento m/z, 165: $C_{10}H_{13}O_2^+$); m/z, 537 $[M+H]^+$ para el β -caroteno y m/z, 597 $[M+H]^+$ para la astaxantina y sus derivados.

II-2.11. Confirmación mediante HPLC-UV con "DIODE ARRAY"

La columna, condiciones de fase móvil, flujo y tiempos utilizados para la confirmación con "diode array" son los mismos que para el HPLC-MS.

Se inyectan patrones de astaxantina y β -caroteno en la opción de multibarrido, en un rango de longitudes de onda comprendido entre 190 y 500 nm (figuras II-4 y II-5).

Para la confirmación de los compuestos se comparan los espectros obtenidos de los patrones con los de las muestras de cangrejo.

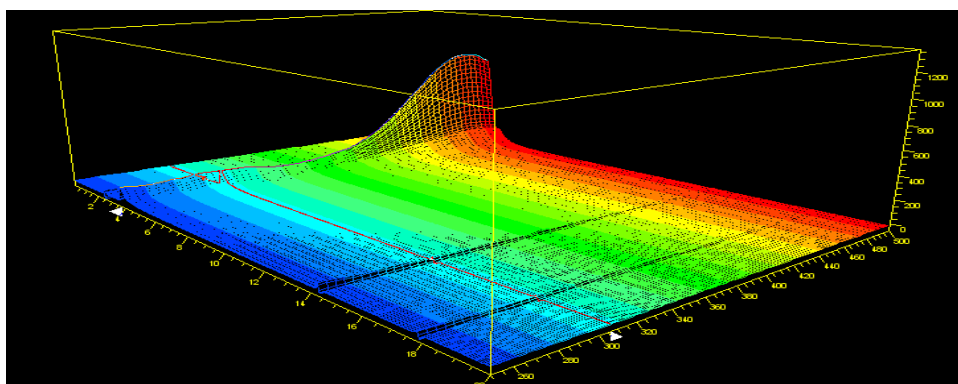


Figura II-4: Espectro 3D del patrón de astaxantina

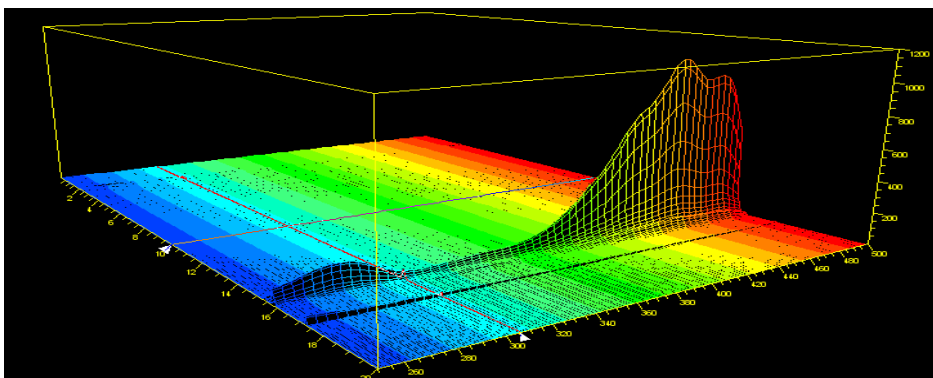


Figura II-5: Espectro 3D del patrón de β -caroteno.

II-3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

II-3.1. Métodos de extracción

Se analizaron los datos obtenidos para la vitamina E y para β -caroteno en veinte muestras de cangrejo con un test estadístico, el test "t", para establecer una comparación entre ambos métodos de extracción. Los resultados indican que para la vitamina E y el β -caroteno no existen diferencias significativas, sin embargo, la astaxantina y sus derivados se degradan en la saponificación.

El método de extracción con acetona se eligió como método de extracción porque presenta varias ventajas:

- ❖ Permite la extracción de vitamina E, β -caroteno, astaxantina y derivados de la astaxantina.
- ❖ Es un método sencillo y de bajo coste.
- ❖ Utiliza pocos solventes.
- ❖ El tiempo necesario para la extracción es corto (alrededor de 20 min.), lo que es de gran relevancia por la inestabilidad de las sustancias analizadas.

El principal problema fue la obtención de muestras sucias, por extraerse conjuntamente otras sustancias que pueden interferir con los compuestos.

La extracción con acetona también es propuesta por Sachindra (Sachindra y col., 2006) para la extracción de carotenoides en los desechos de langosta.

II-3.2. Análisis Cromatográfico

Se inyectaron soluciones patrón de las diferentes sustancias con diferentes flujos, columnas, fases móviles y longitudes de onda para conseguir la optimización del método (Tabla II-1).

Las columnas probadas fueron: Novapak, C18 y Teknochroma Tracer Extrasil ODS 25 cm x 0.4 cm de d.i. y 5 μ m de tamaño de partícula, eligiéndose esta última al obtener mejores resultados.

Como fases móviles se ensayaron: metanol, metanol:acetonitrilo (50:50) y metanol:acetonitrilo:hexano-diclorometano (50:50), siendo esta última mezcla de solventes la que se utiliza como fase móvil (Tabla II-1).

La optimización de las longitudes de onda de fluorescencia se ha realizado mediante multi-barrido. Los patrones de vitamina E se inyectaron en multi-emisión (315-500 nm) y multi-excitación (230-300 nm). La opción multi-barrido se utilizó también como método complementario de confirmación de vitamina E en las muestras.

La vitamina E puede determinarse tanto en la región ultravioleta como en la región de fluorescencia y con ambos métodos de extracción (Figuras II-6 y II-7). La región de fluorescencia se seleccionó porque los cromatogramas muestran picos más específicos y con mayor resolución.

Se han obtenido las longitudes de onda óptimas de fluorescencia (longitud de onda de excitación 330 nm y de emisión 480 nm) para la vitamina A y se han inyectado patrones de la misma en multi-excitación (250-375 nm) (Figura II-8) y en multi-emisión (400-500 nm) (Figura II-9). Sin embargo, no ha sido detectada en las muestras.

En el detector UV la longitud de onda de respuesta es 326 nm.

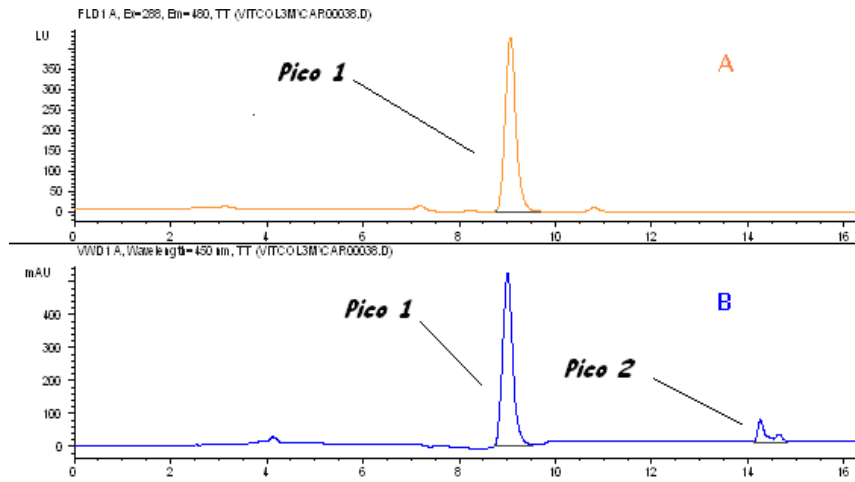


Figura II-6: Cromatograma de una muestra extraída por saponificación A) Detector de fluorescencia. Pico 1: Vitamina E. B) Detector UV/Visible. Pico 1: Vitamina E; Pico 2: β -caroteno.

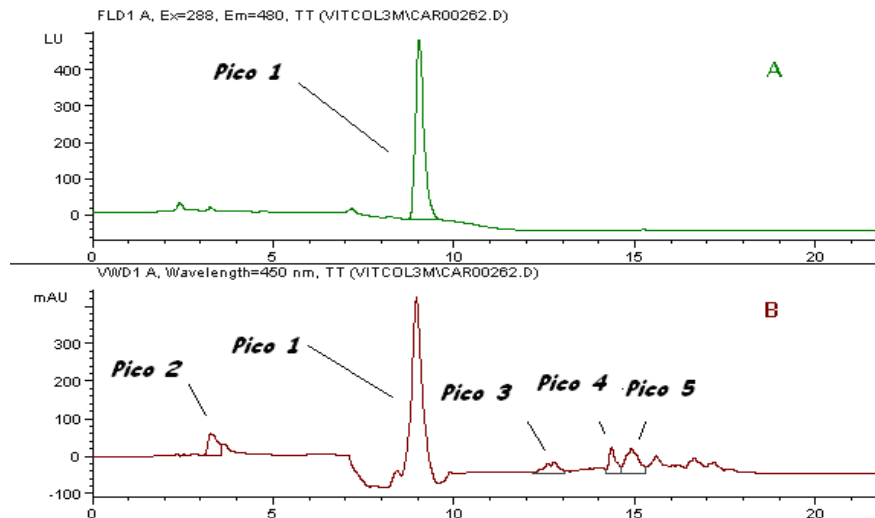


Figura II-7: Cromatograma de una muestra extraída con acetona: A) Detector de fluorescencia. Pico 1: Vitamina E B) Detector UV/Visible. Pico 1: Vitamina E; Pico 2: Astaxantina; Picos 3 y 5: Derivados de astaxantina. Pico 4: β -caroteno.

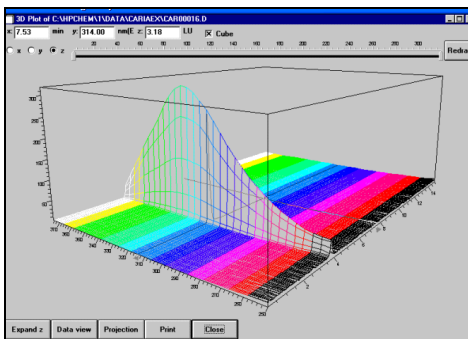


Figura II-8: Patrón de vitamina A en multiexcitación

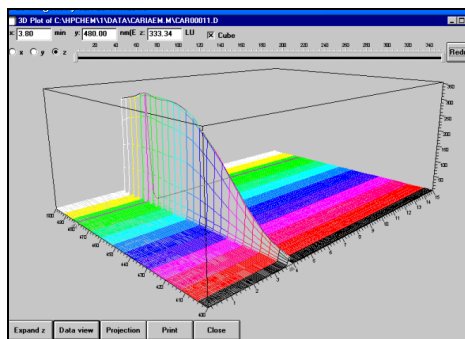


Figura II-9: Patrón de vitamina A en multiemisión

La longitud de onda óptima utilizada en el detector UV/Visible para la identificación de los carotenoides (astaxantina y β -caroteno) fue obtenida mediante el barrido con diode-array de los patrones, siendo similar al encontrado en la bibliografía (Guillou y col., 1993; Rodríguez-Bernaldo de Quirós y col., 2001; Chen y col., 2004; Lima y col., 2005).

El β -caroteno se puede identificar en las muestras obtenidas por ambos métodos de extracción (Figura II-6 y II-7). La astaxantina sólo se puede determinar en las muestras mediante la extracción con acetona. Al final del cromatograma aparecen dos picos a 12 y 15.5 minutos que han sido identificados como derivados de astaxantina (Figura II-7). La saponificación, por el medio alcalino y las elevadas temperaturas, degrada la astaxantina y sus derivados.

Los estudios en el HPLC-MS han confirmado la presencia de vitamina E, astaxantina y β -caroteno, mediante las masas características de acuerdo con sus tiempos de retención. En los picos con tiempos de retención 12 y 15.5 minutos se detectan las masas de la astaxantina, lo que ha permitido su confirmación como derivados de la misma.

II-3.3. Análisis de muestras

Los resultados obtenidos mediante extracción con acetona para las muestras analizadas, se incluyen en la Tabla II-5. Para las muestras del primer año el valor más elevado corresponde a la vitamina E (23.31 mg/100 g m.s.), seguido de la astaxantina (9.42 mg/100 g m.s.), siendo el más bajo el correspondiente al β -caroteno (0.20 mg/100g m.s.).

	Media	Mínimo	Máximo	Desv. Estándar
AÑO 2003				
Vitamina E (mg/100g)	23.31	8.62	61.96	11.20
β -caroteno (mg/100g)	0.20	ND	0.56	0.16
Astaxantina (mg/100g)	1.79	0.63	5.17	1.03
Derivado astax. 1 (mg/100g)	2.88	1.11	4.46	0.85
Derivado astax. 2 (mg/100g)	4.83	2.05	6.9	1.17
AÑO 2005				
Vitamina E (mg/100g)	7.94	1.38	18.34	3.77
β -caroteno (mg/100g)	0.48	0.04	1.12	0.26
Astaxantina (mg/100g)	0.016	0.002	0.039	0.01
Derivados astax. 1 (mg/100g)	0.105	0.007	0.3	0.06
Derivado astax. 2 (mg/100g)	0.178	0.02	0.5	0.08

ND= no detectable

Tabla II-5: Características estadísticas.

En el segundo año la vitamina E sigue siendo el valor más elevado (7.94 mg/100g m.s.), seguido sin embargo del β -caroteno (0.48 mg/100g m.s.) y astaxantina (0.29 mg/100g m.s.). El rango de concentraciones fue muy variable en las muestras.

Se ha cuantificado la concentración de los derivados de la astaxantina, como astaxantina libre (mg/100g m.s.). La suma de los derivados de astaxantina fue de 7.63 y 0.28 mg/100 g de m.s., para el primer y segundo año respectivamente.

La gran disminución observada en los resultados obtenidos para la vitamina E y la astaxantina, parece ser debida al diferente tratamiento de las muestras previo a su análisis, siendo la temperatura de 100 °C la responsable de la posible oxidación de estos compuestos en el secado de las muestras del segundo año.

Estudios de carotenoides realizados por otros autores como Shahidi y Synowiecki (Shahidi y Synowiecki, 1991) en caparazones de gambas y de cangrejos han encontrado valores similares 14.77 mg/100g en m.s. y 13.99 mg/100g en m.s. respectivamente. La astaxantina es más elevada en los caparazones de los cangrejos (25%) que en las gambas (3.95%), aunque en ambos casos el diester de astaxantina fue el mayor carotenoide presente (56% en el cangrejo y 74% en las gambas). En 2004, Naczek y colaboradores (Naczek y col., 2004) analizaron el cangrejo verde capturado en diferentes zonas; el total de los pigmentos carotenoides en la carne del cangrejo se situó entre 5.1 y 19.2 mg/100 g en m.s., mientras que en los caparazones del cangrejo varió de 4.4 a 9.3 μ g/100 g en m.s. El diester de astaxantina fue también el carotenoide presente en cantidades más elevadas, mientras que el

mono-éster de astaxantina y el β -caroteno estuvieron presentes en cantidades más bajas.

Sachindra (Sachindra y col., 2005) analizó carotenoides en cangrejos marinos y de agua dulce. Los carotenoides totales encontrados en el cangrejo fueron más bajos en la carne comparados con el caparazón en ambas especies, siendo el valor más elevado 11.0 $\mu\text{g/g}$ en el caparazón del cangrejo marino. El contenido de astaxantina y de sus ésteres (g/100 g de carotenoides totales) en el cangrejo marino fue del 67% en la carne y 65% en el caparazón, mientras que el contenido en β -caroteno (g/100 g de carotenoides totales) fue de 3.6 en la carne y 5.1 en el caparazón. En el cangrejo de agua dulce, el contenido total de astaxantina y de sus ésteres (g/100 g de carotenoides totales) fue de 36.5 en la carne y 14.7 en el caparazón y el contenido en β -caroteno (g/100 g de carotenoides totales) fue 7.4 en la carne y 3.6 en el caparazón. En 2006 los mismos autores (Sachindra y col., 2006), obtuvieron una recuperación de 40 $\mu\text{g/g}$ del total de carotenoides en caparazones de gambas.

Velu y Munuswamy (2007) encuentran un elevado nivel de carotenoides en la gamba (114.3 $\mu\text{g/g}$ m.s.) correspondiendo el 30% a la astaxantina y el 8.78% al β -caroteno.

Comparando nuestros resultados con los de éstos y otros autores (Wade y col., 2005), la astaxantina fue el carotenoide presente en mayor cantidad en el caparazón del cangrejo de las nieves y sus derivados representan el contenido más elevado.

La variación en la cantidad de carotenoides puede ser atribuida a la diferencia existente de cantidades de pigmentos en la dieta así como a

diferentes condiciones según el lugar de captura (Naczki y col., 2004). En los pescados, la intensidad del color aumenta su valor comercial y la coloración es debida a varios carotenoides siendo la fuente dietética un factor muy importante. Debido al aumento del gasto en acuicultura, interesa el aporte de pigmentos carotenoides a partir de fuentes naturales.

Distintos autores han comprobado que niveles elevados de carotenoides han aumentado la coloración (Lawrence y col., 2002; Liñán-Cabello y col., 2002; Moretti y col., 2006; Sachindra y col., 2006; Velu y Munuswamy, 2007), siendo la astaxantina y sus ésteres los carotenoides presentes en mayor proporción en los crustáceos marinos (Guillou y col., 1993; Qian y Sheng, 1998; Salo-Väänänen y col., 2000; Lawrence y col., 2002; Liñán-Cabello y col., 2002; Comunicación 2004/C 50/01; Lin y col., 2005; Nageswara y col., 2005; Sachindra y col., 2005; Barclay y col., 2006; Moretti y col., 2006; Sachindra y col., 2006).

En estudios realizados por Barclay y col., 2006, sobre el efecto dietético de por lo menos 50 mg/kg de astaxantina libre en la coloración de la langosta, se observa un incremento en la coloración, además de reforzar la inmunocompetencia y la resistencia al estrés.

Con relación a la vitamina E, Kiron (Kiron y col., 2004) examina el efecto de la vitamina E dietética, teniendo en cuenta su carácter antioxidante y respuesta inmune no específica, sobre la trucha arco iris alimentada con diferentes lípidos. La vitamina E en los peces previene la peroxidación de los lípidos en una variedad de tejidos. Sholik (Scholik y col., 2004) analiza el efecto protector de la vitamina E en la dieta contra la exposición al ruido, y los resultados obtenidos sugieren que los suplementos de vitamina E permiten protección contra la exposición al ruido. Para Palace

(Palace y Werner, 2006) el desarrollo reciente en relación con los peces depende de los nutrientes esenciales presentes en el huevo. Las vitaminas E y A funcionan principalmente como antioxidantes para proteger a los lípidos insaturados de la degradación oxidativa. La vitamina A o su provitamina (formas carotenoides) se requiere para la diferenciación y mantenimiento del tejido epitelial.

Hu (Hu y col., 2006) evalúa los requerimientos dietéticos de vitamina A o los suplementos de β -caroteno en el crecimiento del híbrido juvenil de la tilapia, y Oliveira (Oliveira y col., 2007), ha estudiado la utilización industrial de los desechos de gambas como alimento de la tilapia, siendo la conclusión final que podrían ser utilizados como ingrediente en la alimentación de este pescado.

El contenido en vitamina E en nuestras muestras es también importante por su poder antioxidante y protector.

Los resultados revelan la presencia de vitamina E y pigmentos carotenoides, principalmente de astaxantina, en los caparazones del *Chionoecetes opilio*, que pueden utilizarse como fuente natural de estos pigmentos.

II-4. CONCLUSIONES

Se han comparado dos métodos de extracción de vitaminas liposolubles y carotenoides en las muestras del caparazón del *Chionoecetes opilio* y los resultados obtenidos indican que para la vitamina E y el β -caroteno, no existen diferencias significativas. La extracción con acetona permite identificar y cuantificar la astaxantina y sus derivados, mientras que con el método de la saponificación se degradan por acción del calor.

Se ha puesto a punto un método de HPLC para la determinación de vitaminas liposolubles y carotenoides con los detectores en serie de Fluorescencia y UV-Vis. La separación fue llevada a cabo con una columna ODS2. La fase móvil utilizada fue metanol, acetonitrilo y hexano-diclorometano (50:50) en gradiente. La detección y cuantificación del β -caroteno, astaxantina y derivados de la astaxantina se realizan mediante el detector UV-VIS (450 nm) y la cuantificación de vitamina E mediante el detector de fluorescencia (280-331 nm).

Se obtuvieron valores de coeficiente de determinación superiores a 0,996, en la calibración lineal de la astaxantina, vitamina E y β -caroteno. La precisión y recuperación obtenidas fueron también aceptables en todos los casos.

Se han analizado treinta muestras de caparazón de cangrejo en el primer año de estudio (2003). El valor medio más elevado corresponde al de la vitamina E (23.3 mg/100 g de m.s.), seguido del valor de astaxantina total (9.49 mg/100 g de m.s.) y el más bajo fue el del β -caroteno (0.2 mg/100 g de m.s.). En el 2005 se analizaron cuarenta muestras de cangrejo, el valor medio más bajo fue para la astaxantina total (0.29 mg/100 g m.s.) y el más elevado

para la vitamina E (7.94 mg/100 g m.s.), seguido del β -caroteno (0.48 mg/100 g m.s.).

La pérdida de vitamina E y astaxantina en las muestras del año 2005 se debe al tratamiento de las muestras a 100 °C, lo que produce la oxidación de dichos compuestos y por tanto la pérdida de los mismos.

El contenido de vitamina E y carotenoides presentes en los caparazones del *Chionoecetes opilio* es también importante y dependiente del tratamiento térmico de las muestras. La presencia de vitamina E, astaxantina y β -caroteno indica la conveniencia del uso de este recurso para la elaboración de piensos en acuicultura.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Chemical Society (ACS), (1980). Subcommittee of Environmental Analytical Chemistry. Analytical Chemistry, 52: 2242.

Barclay, M.C.; Irvin, S.J.; Williams, K.C.; Smith, D.M. (2006). Comparison of diets for the tropical spiny lobster *Panulirus ornatus*: Astaxanthin-supplemented feeds and mussel flesh. Aquaculture Nutrition, 12: 117-125.

Chen, J.P.; Tai, C.Y.; Chen, B.H. (2004) Improved liquid chromatographic method for determination of carotenoids in Tawanese mango (*Mangifera indica* L.). Journal of Chromatography A, 1054: 261-268.

Comunicación 2004/C 50/01. Lista de aditivos autorizados en los piensos, publicada conforme a lo dispuesto en la letra b) del artículo 9 *unvicies* de la Directiva 70/524/CEE del Consejo sobre los aditivos en alimentación animal. DOUE C50, 25-02-2004.

Guillou, A.; Choubert, G.; de la Noüe, J. (1993). Separation and determination of carotenoids, retinol, retinal and dehydro forms by isocratic reversed-phase HPLC. Food Chemistry, 476: 93-99.

Hu, C.; Chen, S.; Pan, C.; Huang, C. (2006). Effects of dietary vitamin A or β -carotene concentrations on growth of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* \times *O. aureus*. Aquaculture 253: 602-607.

Kiron, V.; Puangkaew, J.; Ishizaka, K.; Satoh, S.; Watanabe, T. (2004). Antioxidant status and non-specific immune responses in rainbow trout

(*Oncorhynchus mykiss*) fed two levels of vitamin E along with three lipid sources. *Aquaculture*, 234: 361-379.

Lawrence, J.M.; Tsushima, M.; George, S.B.; Lawrence, A.L.; Plank, L.R. (2002). Carotenoids and sea urchins. *Panorama Acuicola*, 7: 24-25.

Lima, V.L.A.G. ; Meló, E.A. ; Maciel, M.I.S. ; Prazeres, F.G. ; Musser, R.S. ; Lima, D.E.S. (2005). Total phenolic and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages. *Food Chemistry*, 90: 565-568.

Lin, V.; Chien, J.; Chen, B. (2005). Determination of Carotenoids in Spear Shrimp Shells (*Parapenaeopsis hardwickii*) by Liquid Chromatography J. *Agr. Food Chemistry*, 53: 5144.

Liñán-Cabello, M.A.; Paniagua-Michel, J.; Hopkins, P.M. (2002). Bioactive roles of carotenoids and retinoids in crustaceans. *Aquaculture Nutrition*, 8: 299-309.

López, M.; Arce, L.; Garrido, J.; Ríos, A.; Valcárcel, M. (2004). Selective extraction of astaxanthin from crustaceans by use of supercritical carbon dioxide. *Talanta*, 64: 726-731.

Moretti, V.M.; Mentasti, T.; Bellagamba, F.; Luzzana, U.; Caprino, F.; Turchini, J.M.; Giani, I.; Valfre, F. (2006). Determination of astaxanthin stereoisomers and colour attributes in flesh of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a tool to distinguish the dietary pigmentation source. *Food Addit. Contam.*, 23 (11): 1056- 1063.

Naczek, M.; Williams, J.; Brennan, K.; Liyanapathirana, C.; Shahidi, F. (2004). Compositional characteristics of green-crab (*Carcinus maenas*). Food Chemistry, 88: 429-439.

Nageswara R.; Naseeruddin, S.; Nageswara, B. (2005). Preparative isolation and characterization of some minor impurities of Astaxanthin by high-performance liquid chromatography. Journal Chromatography A, 1076: 189-192.

Oliveira, J.M.; Oliveira, E.; Singh, P. (2007). Utilization of shrimp industry waste in the formulation of tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) feed. Bioresource Technology, 98: 602-606.

Palace, V.P.; Werner, J. (2006). Vitamins A and E in the maternal diet influence egg quality and early life stage development in fish: a review. Scientia Marina, 70: 41-57.

Qian, H.; Sheng, M. (1998) Simultaneous determination of fat-soluble vitamins A, D and E and provitamin D₂ in animal feeds by one-step extraction and high performance liquid chromatographic analysis. Journal Chromatography A., 825 (2): 127-133.

Rodríguez- Bernaldo de Quirós, A.; López-Hernández, J.; Simal-Lozano, J. (2001). Determination of carotenoids and liposoluble vitamins in sea urchin (*Paracentrus lividus*) by high performance liquid chromatography. European Food Research Technology, 212: 687-690.

Rosa, R.; Nunes, M.L. (2003). Nutritional quality of red shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso), pink shrimp, *Parapenaeus longirostris* (Lucas), and Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (Linnaeus). J. Sci. Food Agric., 84: 89-94.

Sachindra, N.M.; Bhaskar, N.; Mahendrakar, N.S. (2005). Carotenoides in crabs from marine and fresh waters of India. LWT, 38: 221-225.

Sachindra, N.M.; Bhaskar, N.; Mahendrakar, N.S. (2006). Carotenoids in *Solonocera indica* and *Aristeus alcocki*, Deep-Sea Shrimp from Indian Waters. Waste Manage, 26: 1092.

Salo-Väänänen, P.; Ollilainen, V.; Mattila, P.; Lehtikainen, K.; Salmela-Mölsä, E.; Piironen, V. (2000) Simultaneous HPLC analysis of fat-soluble vitamins in selected animal products after small-scale extraction. Food Chemistry, 71: 535-543.

Scholik, A.R.; Lee, U.; Chow, C.K.; Yan, H.Y. (2004). Dietary vitamin E protects the fathead minnow, *Pimephales promelas*, against noise exposure. (2004). Comparative Biochemistry Physiology, Part C 137: 313-323.

Shahidi, F.; Synowiecki, J. (1991). Isolation and characterization of nutrients and value-added products of Snow Crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39: 1527-1532.

Velu, C.S.; Munuswamy, N. (2007). Composition and nutritional efficacy of adult fairy shrimp *Streptocephalus dichotomus* as live feed. Food Chemistry, 100: 1435-1442.

Wade, N.; Goulter, K.C.; Wilson, K.J.; Hall, M.R.; Degnan, B.M. (2005). Esterified astaxanthin levels in lobster epithelia correlate with shell colour intensity: Potential role in crustacean shell colour formation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*: 307-313.

III- DETERMINACIÓN DE CENIZAS y MINERALES **(CALCIO, FÓSFORO Y MAGNESIO)**

RESUMEN

En este capítulo se describe la determinación de cenizas por incineración en un horno a 550 °C hasta la obtención de cenizas grises, obteniendo 31.52 g/100 g ms en las muestras del primer año de estudio y 26.37 g/100 g m.s. en las del segundo año.

En las cenizas se ha determinado la presencia de calcio, fósforo y magnesio, obteniéndose valores de 9.30, 1.61 y 0.91 g/100g m.s. para el año 2003 y 7.71, 1.35 y 0.81 g/100g m.s. para el año 2005, respectivamente.

III-1. INTRODUCCIÓN

Las especies acuáticas pueden absorber muchos de los minerales requeridos del medio acuático a través de sus agallas y piel, permitiendo una compensación en caso de ser necesario. Para algunas especies, en determinados estados fisiológicos y medios de cultivo, esos minerales deben ser añadidos a la dieta con el fin de evitar desajustes y permitir buenos niveles de desarrollo. Por ejemplo, en agua dulce, generalmente hay suficiente concentración de Ca, Na, K y Cl para que las especies acuáticas cubran sus requerimientos absorbiéndolos del medio, debiendo mediante la dieta cubrir el resto de necesidades minerales.

Con relación a los crustáceos, siempre se ha hablado del posible efecto negativo de la deficiencia mineral sobre la reproducción, especialmente sobre la resorción de oocitos, calidad de huevos y reducción en el perfil reproductivo. Bajos niveles de Ca y Mg en dietas de reproductores de *L. vannamei*, baja los niveles de los mismos en músculo y hepatopancreas (Álvarez Aranguiz, 2006).

III-2. PARTE EXPERIMENTAL

III-2.1. Material y aparatos

- ❖ Espectrofotómetro Cary 3E UV-visible. VARIAN.
- ❖ Horno EML 11/6.
- ❖ Cápsulas. AFORA.

III-2.2. Reactivos

- ❖ Molibdato amónico. MERCK.
- ❖ Metavanadato de amonio. MERCK.
- ❖ Ácido clorhídrico fumante al 37%. MERCK.
- ❖ Fosfato potásico dihidrogenado. MERCK.
- ❖ Etilendiamino tetracético (EDTA) (sal sódica). MERCK.
- ❖ Ácido nítrico. MERCK.
- ❖ Hidróxido sódico 35%. MERCK.
- ❖ Ácido calcón carboxílico. MERCK.
- ❖ Cloruro amónico. MERCK.
- ❖ Amoníaco. PROBUS S.A.
- ❖ Negro de eriocromo t. RIEDEL-DE HAEN AG.
- ❖ Agua purificada, obtenida por ósmosis en un equipo MILLI-Q, MILLIPORE.

III-2.3. Análisis de minerales

Para el análisis de minerales se han determinado previamente las cenizas. La determinación se realizó por incineración en un horno a una temperatura ≤ 550 °C hasta la obtención de cenizas grises.

El fósforo se determinó en las cenizas espectrofotométricamente, leyendo la Absorbancia a 430 nm, usando como reactivo el molibdato-vanadato. Para el patrón de fósforo, se preparó una solución madre en agua milli-Q con fosfato potásico dihidrogenado, con una concentración de 1 g P/l. El rango de concentraciones utilizado para las rectas de calibrado fue de 2 y 60 mg/l.

Para llevar a cabo el análisis, el reactivo molibdato-vanadato (10 ml) se agrega a alícuotas de ceniza (10 mg), se enrasa a un volumen conocido (50 ml) y se lee la absorbancia a 430 nm. Mediante las rectas de regresión se calcula la concentración del fósforo.

Para la determinación de calcio y magnesio, las cenizas (20 mg), se digieren en ácido nítrico concentrado (10 ml) y se analizan por complexometría, utilizando NaOH al 35% como tampón y ácido calcón carboxílico como indicador para el calcio, y $\text{NH}_3/\text{ClNH}_4$ como tampón y negro de eriocromo t como indicador para el magnesio. La complexona (EDTA) 0.1N se empleó como reactivo para la valoración.

III-3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como primer estudio se ha realizado un análisis del caparazón del cangrejo por espectrometría de fluorescencia de rayos X de dispersión de energía detectándose la presencia de fósforo, azufre, calcio, cloro y potasio, como componentes mayoritarios y como componentes minoritarios hierro, manganeso, níquel, zinc y arsénico.

Las cenizas se han determinado por incineración de las muestras, con la diferencia de que para el primer año se utilizaron sólo los caparazones, mientras que para el segundo se determinaron en el conjunto de caldo y caparazón debido a la cantidad de contenido que presentaban las muestras. La diferencia de resultados no ha sido importante, ya que los valores obtenidos han sido 31.52 ± 3.9 y 26.37 ± 6.4 para el 2003 y 2005 respectivamente. El valor medio de cenizas obtenido fue de 28.5 ± 6.0 .

El fósforo, calcio y magnesio se han valorado directamente en las cenizas. Los valores más altos corresponden al calcio (valor medio 2003, 9.30 g/100g m.s. y valor medio 2005, 7.71 g/100g m.s.), seguidos del fósforo (valor medio 2003, 1.61 g/100g m.s. y valor medio 2005, 1.35 g/100g m.s.) y del magnesio (valor medio 2003, 0.91 g/100g m.s y valor medio 2005, 0.81 g/100g m.s.). Los resultados de cenizas y minerales obtenidos para las muestras analizadas se incluyen en la Tabla III-1.

PARÁMETROS	MEDIA ^a ±SD ^b 2003	MEDIA ^a ±SD ^b 2005
Cenizas (g/100g m.s.)	31.52±3.9	26.37±6.4
P (g/100g m.s.)	1.61±0.53	1.35±0.28
Ca (g/100g m.s.)	9.30±1.5	7.71±2.1
Mg (g/100g m.s.)	0.91±0.26	0.81±0.33

^a Media g/100g materia seca

^b Desviación estándar

Tabla III-1: Valores de cenizas y minerales.

La Figura III-1, muestra los valores obtenidos para cada año de muestreo.

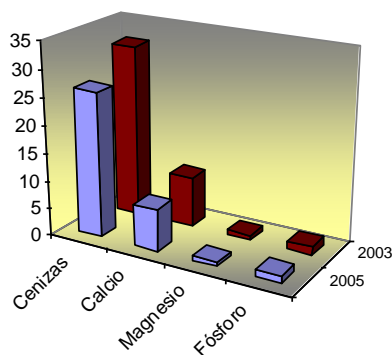


Figura III-1: Valores de cenizas y minerales obtenidos en ambos años de muestreo.

La relación entre cenizas y calcio, y fósforo y magnesio, se recoge en las figuras siguientes (Figuras III-2, III-3, III-4 y III-5):

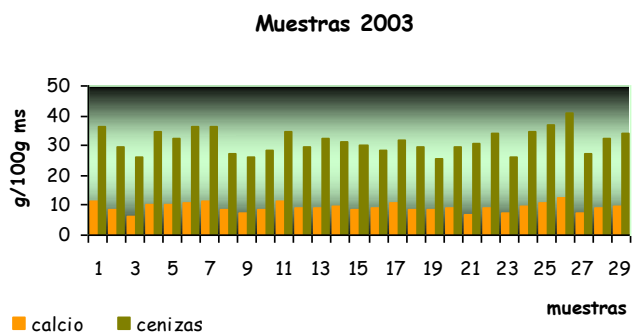


Figura III-2: Relación calcio-cenizas de las muestras analizadas en el año 2003.

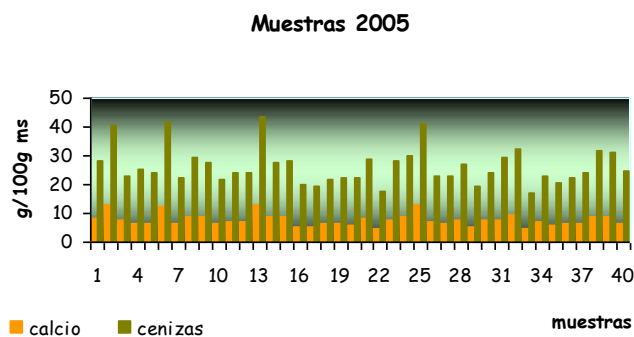


Figura III-3: Relación calcio-cenizas de las muestras analizadas en el año 2005.

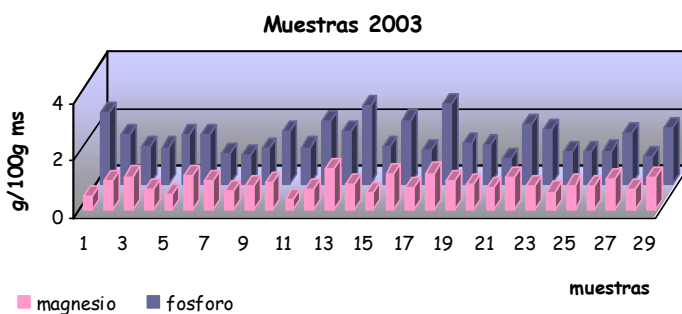


Figura III-4: Relación magnesio-fósforo de las muestras analizadas en el año 2003.

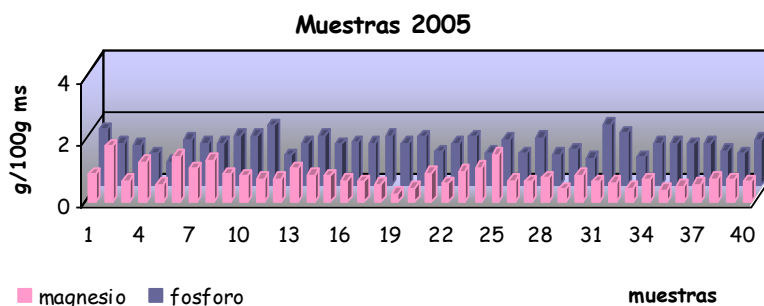


Figura III-5: Relación magnesio-fósforo de las muestras analizadas en el año 2005.

En el análisis descriptivo se ha analizado la correlación entre cenizas, calcio y magnesio, encontrándose que es significativa en todos los casos siendo entre las cenizas y el calcio próxima a 1 (Tabla III-2).

		CENIZAS	CALCIO	MAGNESIO
Cenizas	Correlación de Pearson	1	,950(**)	,514(**)
	Sig. (Bilateral)		,000	,000
	N	69	69	69
Calcio	Correlación de Pearson	,950(**)	1	,467(**)
	Sig. (Bilateral)	,000		,000
	N	69	69	69
Magnesio	Correlación de Pearson	,514(**)	,467(**)	1
	Sig. (Bilateral)	,000	,000	
	N	69	69	69

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Tabla III-2: Correlaciones entre cenizas, calcio y magnesio.

Comparando nuestros resultados con los de otros estudios, Manu-Tawiah y Harwaard, encuentran cantidades similares de cenizas en

caparazones de *Chionoecetes opilio* (31 g/100g m.s.) mientras que Heu y col. (2003) encuentran cantidades un poco mas elevadas en subproductos de camarones. Con relación a los minerales las cantidades obtenidas para nuestro cangrejo son casi siempre más elevadas para el calcio, el fósforo y el magnesio que las indicadas por otros autores en la carne de crustáceos (Shahidi y Synowiecki, 1992; Skonberg y Perkins, 2002; Heu y col., 2003; Gökoolu y Yerlikaya, 2003; Musaiger y Al-Rumaidh, 2005; Küçükgülmez y col., 2006) (Tabla III.3).

	P (mg/100g m.s.)	Ca (mg/100g m.s.)	Mg (mg/100g m.s.)	Referencias
Camarones	2270	15130	935	Shahidi y Synowiecki, 1992
Carne green crab	622	341	129	Skonberg y Perkins, 2002
<i>Callinectes sapidus</i> (carne)	851.1	606	204	Gökoolu y Yerlikaya, 2003
<i>Portunus pelagicus</i> (carne)	577.1	500	220	
Camarón	172.5	83.9	41.5	Heu y col., 2003
Productos de desecho de camarón	369	3205	123	Heu y col., 2003
Cangrejo <i>Portunus pelagicus</i>				
Carne cruda	298	114	40	Musaiger y Al-Rumaidh, 2005
Carne cocinada	223	250	63	
<i>Callinectes sapidus</i> (carne)	883	1992	470	Küçükgülmez y col., 2006

Tabla III-3: Concentraciones de macrominerales en carne y subproductos de crustáceos.

III-4. CONCLUSIONES

Los minerales son elementos inorgánicos necesarios en cualquier dieta para mantener un correcto desarrollo y funciones metabólicas normales.

El contenido de cenizas en los caparazones del *Chionoecetes opilio* es elevado, del orden de 30 g/100 g m.s. y está correlacionado con el contenido en calcio. Los contenidos en magnesio y fósforo son también importantes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Álvarez Aranguiz, A. (2006). Informe sobre el aprovechamiento del cefalotórax de cangrejo rojo como ingrediente de dietas para especies acuáticas (<http://www.roxocanval.org/Doc/CangrejoRojo.pdf>)

Gökoolu, N.; Yerlikaya, P. (2003). Determination of proximate composition and mineral contents of blue crab (*Callinectes sapidus*) and swim crab (*Portunus pelagicus*) caught off the Gulf of Antalya. Food Chemistry, 80: 495-498.

Heu, M.; Kim, J.; Shahidi, F. (2003). Components and nutritional quality of shrimp processing by-products. Food Chemistry, 82: 235-242.

Küçükgülmez, A.; Çelik, M., Yanar, Y.; Ersoy, B.; Çikrikçi, M. (2006). Proximate composition and mineral contents of the blue crab (*Callinectes sapidus*) breast meat, claw meat and hepatopancreas. International Journal of Food Science and Tehnology, 41: 1023-1026.

Manu-Tawiah W; Haard NF (1987). Recovery of carotenoprotein from the exoskeleton of snow crab *Chionoecetes opilio*. Canadian Institute Food Sci. Technol. J., 20: 31-33.

Musaiger, A.O.; Al-Rumaidh, M.J. (2005). Proximate and mineral composition of crab meat consumed in Bahrain. International Journal of Food Science and Nutrition, 56: 231-235.

Shahidi, F.; Synowiecki, J. (1992). Quality and compositional characteristics of Newfoundland shellfish processing discards. Mem.Univ. Newfoundland, St. John's, Elsevier, London.

Skonberg, D.I.; Perkins, B.L. (2002). Nutrient composition of green crab (*Carcinus maenas*) leg meat and claw meat. Food Chemistry, 77: 401-404.

IV- DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS Y AMINOÁCIDOS

Parte de este trabajo se ha publicado:

"Protein and amino acid contents in the crab, *Chionoecetes opilio*". M. Vilasoa-Martínez;
J. López-Hernández; M. A. Lage-Yusty. 2007. *Food Chemistry*, 103 (4), 1330-1336.

RESUMEN

La determinación de proteínas totales se ha hecho mediante el método de Kjeldahl y el contenido de aminoácidos por cromatografía líquida de alta resolución.

Las proteínas se determinaron en los caparazones y en el caldo de los mismos independientemente en el primer año de estudio, mientras que en el segundo se analizó conjuntamente. Esta determinación se llevó a cabo con un Bloc-Digest en condiciones de tiempo y temperatura óptimas, seguidas de una destilación del nitrógeno, pro-nitro (Unit-distilling).

Se ha utilizado un método de HPLC para el análisis de los aminoácidos presentes en los caparazones de los cangrejos, previa derivatización de las muestras con fenilisotiocianato. Los aminoácidos resultantes han sido separados mediante una columna ODS2 y empleando un detector UV a una longitud de onda de 254 nm. La fase móvil utilizada consistió en una mezcla de tampón de acetato sódico 0.14M, con pH ajustado a 6.2, conteniendo 0.05% de trietilamina y acetonitrilo:agua en proporción 60:40 (v/v), a un flujo de 0.9 ml/min.

Los aminoácidos presentes en concentraciones más elevadas fueron la arginina, lisina, ácido glutámico y serina.

IV-1. INTRODUCCIÓN

Las proteínas son macromoléculas constituidas a partir de aminoácidos que desempeñan funciones diversas, todas ellas de gran importancia en los seres vivos. Se encuentran en gran cantidad en cualquier tipo de organismo, representando aproximadamente la mitad del peso seco de las células (Mataix, 2002).

Los aminoácidos (AA) son moléculas de bajo peso molecular con una parte común, el grupo alfa-amino-carboxilo (Figura IV-1), y otra variable, de gran diversidad. Además del carbono, hidrógeno y oxígeno, los aminoácidos contienen nitrógeno en su grupo amino. Algunos aminoácidos también contienen azufre en su molécula.

En la naturaleza existen centenares de aminoácidos diferentes. De ellos, sólo veinte se utilizan en la formación de proteínas, por ello se conocen como aminoácidos proteinógenos (Mataix, 2002).

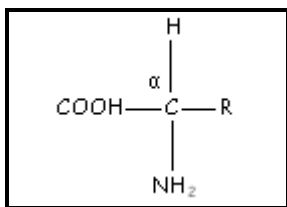


Figura IV-1: Estructura general de los aminoácidos.

Los 20 aminoácidos encontrados en las proteínas tienen todos un grupo carboxílico y un grupo amino unidos al mismo átomo de carbono (carbono α). Difieren unos de otros en sus cadenas laterales, o grupos R, que varían en estructura, tamaño y carga eléctrica y que influyen en la solubilidad en agua de los aminoácidos (Leningher, 1993). Los aminoácidos pueden

clasificarse atendiendo a diferentes criterios. En función de la naturaleza del grupo R la glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina y prolina son aminoácidos con grupos R apolares alifáticos; la fenilalanina, tirosina y triptófano presentan grupos R aromáticos; los grupos R de la serina, treonina, cisteína, metionina, asparagina y glutamina son polares sin carga; mientras que el aspartato y glutamato están cargados negativamente, la lisina, arginina e histidina lo están positivamente.

Desde el punto de vista de la nutrición hay nueve aminoácidos clasificados como esenciales para el hombre, debido a que la síntesis corporal es inadecuada para satisfacer las necesidades metabólicas y por lo tanto deben ser suplementados como parte de la dieta. Estos aminoácidos son histidina, leucina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina (NAS/IOM/FNB, 2005). Para la mayoría de las especies acuáticas los aminoácidos esenciales que deben consumir en la dieta son los mismos que para el hombre y además arginina; de estos generalmente los limitantes suelen ser metionina y lisina (Álvarez Aranguiz, 2006).

Generalmente, se considera que la carne del pescado y del marisco tiene un elevado valor nutritivo debido a la cantidad de proteínas con aminoácidos esenciales que contienen. Además de su importancia dietética, las proteínas afectan a la textura de los alimentos, así como los péptidos pequeños y los aminoácidos influyen en la comida sazónada (De la Cruz-García y col, 2000).

Los invertebrados marinos se están utilizando ampliamente como alimento y como suplementos alimenticios en muchos lugares del mundo. Se

considera que los cangrejos y sus subproductos, entre otros muchos invertebrados, son un producto importante (Gökoolu y Yerlikaya, 2003).

La mayoría de especies acuáticas cultivadas en España, y en particular en Galicia, son especies carnívoras o, en algunos casos, omnívoras. Por ello, generalmente las dietas son muy ricas en proteínas (40-60%), lo cual conlleva a una excreción elevada de nitrógeno (NH_4 , NH_3) al agua, relacionada directamente con la cantidad y calidad de la proteína suministrada en el alimento. Por ello, como indica Álvarez Aranguiz, 2006, la proteína y su digestibilidad, es uno de los nutrientes clave en las especies acuáticas, no solamente como nutriente, sino por la importancia sobre la calidad del agua y desde el punto de vista económico.

La proteína en las dietas es necesaria como fuente de AA esenciales y nitrógeno, y para la síntesis de AA no esenciales. Los AA son necesarios para el mantenimiento, crecimiento y la reproducción. Si el nivel proteico de la dieta es el adecuado pero no lo es el perfil de AA, parte de los AA consumidos pueden ser catabolizados como fuente de energía, produciendo y liberando amonio (Álvarez Aranguiz, 2006).

Durante los últimos años, la evolución de la instrumentación analítica ha permitido la detección y cuantificación de los aminoácidos con gran exactitud, además hay un creciente interés en el desarrollo de métodos de análisis fiables, rápidos y exactos para evaluar la calidad de los alimentos con propósitos nutricionales o reguladores (Sánchez-Machado, 2003a). Se han propuesto muchos métodos analíticos para el análisis de aminoácidos, incluyendo cromatografía de gases, HPLC y electroforesis capilar.

Como métodos más usados para el análisis de aminoácidos se encuentra la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) Este tipo de cromatografía conduce a mejores separaciones en un tiempo mucho más corto, simple instrumentación y bajos costes (Sánchez-Machado y col., 2003 b). El empleo de reactivos de derivatización es esencial porque permite la detección cromatográfica y aumenta el grado de hidrofobicidad de los aminoácidos (Nollet, 2000). Entre los reactivos de derivatización más usados se encuentra el cloruro de dansilo (De Barber y col., 1989), 9-Fluorenilmetil cloroformato (FMOC-Cl) (Einarsson y col., 1986; Schuster, 1988; Fabiani y col., 2002); o-Phtalaldehido (OPA) (Rajendra, 1987; Blakenship y col., 1989; Godel y col., 1992; Vázquez-Ortiz y col., 1995; Dorresteiyn y col., 1996) y Fenilisotiocianato (PITC) (Sherwood, 1990; Calull y col., 1991; Fierabracci y col., 1991; Senden y col., 1992; González-Castro y col., 1997). Cada uno de estos reactivos tiene ventajas y limitaciones (Sánchez-Machado, 2003a).

Entre ellos, sólo PITC, FMOC-Cl y OPA se utilizan ampliamente para el análisis de aminoácidos; aunque los métodos de derivatización con PITC son menos sensibles si se comparan con métodos basados en la detección fluorimétrica, mientras que OPA no reacciona con aminoácidos secundarios, y para FMOC-Cl la reacción es rápida. También se recomienda usar la combinación OPA/FMOC-Cl realizando la detección UV de los derivados a la longitud de onda óptima para los aminoácidos primarios y secundarios, para mejorar la sensibilidad (Sánchez-Machado, 2003a). En la cuantificación de los aminoácidos de hidrolizados proteicos, en diversos alimentos y muestras biológicas, por HPLC y con PITC, los feniltiocarbamil derivados resultantes son separados por fase reversa e identificados con detección ultravioleta a 254 nm (Sánchez-Machado y col., 2003b).

Otros autores no emplean la derivatización y la separación de aminoácidos se realiza mediante un analizador de aminoácidos (Heu y col., 2003; Naczk y col., 2004).

En el presente estudio se han determinado, en muestras de caparazón de cangrejo *Chionoecetes opilio*, proteínas mediante el método de Kjeldahl y contenido en aminoácidos por cromatografía líquida de alta resolución previa derivatización con fenilisotiocianato.

IV-2. PARTE EXPERIMENTAL

IV-2.1. Material y aparatos

- ❖ Equipo de digestión "Bloc-Digest". JP SELECTA.
- ❖ Unidad de destilación "Pro-Nitro". JP SELECTA.
- ❖ Cromatógrafo de líquidos Spectra-Physics, equipado con una bomba cuaternaria PV-1580, loop de inyección de 20 µl y detector de escaneo óptico Spectra Focus UV-visible, Software Jasco ChromPass Chromatography Data System para Windows (versión 1.7.403.1). Columna ODS2 Teknochroma, en fase reversa de 25 cm x 0.4 cm de d.i. y 5 µm de tamaño de partícula. Termostatizador Spectra-Physics, modelo SP8792.
- ❖ Filtros de papel Whatman N°41.
- ❖ Filtros MFS-13, membrana PTFE (Tamaño de poro 0.45 µm, diámetro de 13 mm). ADVANTEC MFS/Inc.
- ❖ Viales de 1.5 ml.
- ❖ Otro material de uso corriente en el laboratorio.

IV-2.2. Patrones

- ❖ Patrones de los aminoácidos. SIGMA CHEMICAL COMPANY.
 - L-alanina.
 - L-arginina.
 - L-ácido aspártico.
 - L-ácido glutámico.
 - L-glicina.
 - L-histidina.
 - L-isoleucina.

- L-leucina.
- L-lisina.
- L-metionina.
- L-fenilalanina.
- L-hidroxiprolina.
- L-prolina.
- L-serina.
- L-treonina.
- L-tirosina.
- L-valina.

IV-2.3. Reactivos

- ❖ Catalizador Kjeldahl (6.25% en $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). JP SELECTA.
- ❖ Acetanilida. JP SELECTA.
- ❖ Ácido Sulfúrico al 95-97%. MERCK.
- ❖ Hidróxido sódico al 35%. MERCK.
- ❖ Ácido clorhídrico fumante al 37%. MERCK.
- ❖ Fenol. AnalaR (Hopkin & Williams).
- ❖ Ácido bórico. MERCK.
- ❖ Azul del metileno. MERCK.
- ❖ Rojo de metilo. MERCK.
- ❖ Acetonitrilo. MERCK.
- ❖ Metanol. MERCK.
- ❖ Fosfato sódico (Na_2HPO_4). SIGMA.
- ❖ Trietilamina (TEA). CARLO ERBA.
- ❖ Agua de grado HPLC, obtenida por ósmosis en un equipo MILLI-Q, MILLIPORE.

- ❖ Reactivo de derivatización:
 - Fenilisotiocianato (PITC). SIGMA.
- ❖ Acetato sódico. PANREAC.

IV-2.4. Método directo para la determinación de proteínas

Para la determinación de proteínas se ha valorado el nitrógeno total utilizando un bloque de digestión y un destilador semiautomático.

El equipo de digestión "Bloc-Digest" (Figura IV-2) ofrece una serie de ventajas respecto al método convencional de Kjeldahl. Permite una regulación automática de la temperatura y del tiempo de digestión, además de asegurar el calentamiento uniforme de las muestras. Las muestras se ordenan mediante una gradilla-soporte de tubos, manipulándose menos y se puede colocar adaptado un colector de humos, con lo que se evita tener que utilizar una vitrina especial, ya que los gases son aspirados mediante una trompa de vacío. Con este dispositivo se puede trabajar con hasta 5 g o 15 ml de muestra, siendo el tiempo de mineralización de 15 a 45 minutos según la muestra a digerir, obteniéndose una reproducibilidad de un 1% en valor relativo.



Figura IV-2: Equipo de digestión "Bloc-Digest" de J.P. Selecta.



Figura IV-3: Unidad de destilación "Pro-Nitro" de J.P. Selecta.

La unidad de destilación "Pro-Nitro" (Figura IV-3) es semiautomática, independiente, de destilación por arrastre de vapor, con generador incorporado, que ofrece las siguientes ventajas: No se trasvasan las muestras ya que se utiliza el mismo tubo en que se ha digerido la muestra para destilarla. Tampoco hay que manipular reactivos, ya que, el hidróxido sódico se añade con un dosificador regulable; el tiempo de destilación es mínimo. También cabe destacar el bajo mantenimiento del generador de vapor ya que se trabaja en circuito cerrado de alimentación de agua destilada.

El método propuesto con este dispositivo es una adaptación al Método Oficial de la AOAC que es reconocido internacionalmente.

IV-2.4.1. Principio

El método consistió en mineralizar la muestra con ácido sulfúrico concentrado y alcalinizarla con una solución de hidróxido sódico. El amonio liberado fue transferido por destilación y recuperado sobre una solución de

ácido bórico. La valoración posterior con ácido clorhídrico permite el cálculo de la cantidad inicial del amonio presente en la muestra.

IV-2.4.2. Digestión (Bloque de digestión, J.P. Selecta, S.A., España)

Se pesan 0.3 g de muestra, perfectamente molida y homogeneizada, sobre papel libre de nitrógeno y se introduce en el tubo de digestión. Se añaden 4 g de catalizador Kjeldahl, 25 ml de ácido sulfúrico al 96% (d=1.84) y unas perlas de vidrio para evitar proyecciones en el contenido del tubo.

Los tubos con las muestras se colocan en el interior del bloque de digestión con la campana de extracción conectada, para evitar posibles inhalaciones de vapor que pueden llegar a desprenderse del bloque. A continuación la digestión se lleva a cabo mediante un programa de temperaturas, inicialmente 125 °C 30 minutos, subida hasta 200 °C permaneciendo 30 minutos a esa temperatura y por último se sube a 400 °C manteniéndose 120 minutos, siendo el total de tiempo empleado en la digestión 180 minutos.

Al final del proceso, se obtiene un líquido de color azul transparente y se deja enfriar a temperatura ambiente. Se le adicionan entonces lentamente 50 ml de agua destilada a cada tubo digestor. Se dejan enfriar de nuevo. Aunque no sucedió con nuestras muestras, si aparece precipitado, el contenido del tubo debe agitarse con cuidado o debe calentarse ligeramente.

IV-2.4.3. Destilación

En un matraz erlenmeyer se introducen 50 ml de una solución de ácido bórico al 4% (p/v) y unas gotas de indicador mixto. El erlenmeyer se coloca debajo del refrigerante, y se asegura que el tubo de salida esté

sumergido en la solución de ácido bórico. Después de situar el tubo digestor con la muestra y el erlenmeyer en el sitio correspondiente se añaden 50 ml de NaOH al 35% y se lleva a cabo la destilación durante el tiempo que sea necesario hasta que se haya destilado un mínimo de 150 ml, proceso que suele durar aproximadamente entre 5 y 10 minutos.

IV-2.4.4. Blanco

Después de la destilación de la muestra, se lleva a cabo un test en blanco con el método descrito y utilizando 5 ml de agua destilada en lugar de la muestra.

IV-2.4.5. Valoración

El destilado obtenido se valora con ácido clorhídrico 0.1N hasta que se produce un viraje de la solución de color verde a púrpura.

IV-2.4.6. Determinación de nitrógeno

La determinación de nitrógeno y de proteínas en las muestras se ha realizado teniendo en cuenta las siguientes fórmulas:

$$\text{a) \% Nitrógeno} = [1.4 \times N \times (V_1 - V_0) \times f] / P$$

Siendo, N, la normalidad del ácido clorhídrico; V_1 , el volumen de ácido clorhídrico utilizado en la valoración (ml); V_0 , volumen de ácido clorhídrico gastado en el blanco (ml); f, factor de corrección del HCl 0.1N y P, peso de la muestra en gramos.

$$\text{b) \% Proteína} = \% \text{ Nitrogeno} \times F$$

Siendo, F, el factor de conversión para pasar de % Nitrógeno a % Proteína.

Para proteína cruda normalmente se utiliza un valor de 6.25. Dependiendo de la naturaleza de la muestra, pueden usarse otros factores de conversión y mejorar así la exactitud.

IV-2.4.7. Verificación de la determinación de nitrógeno (Recuperación medida con Acetanilida)

IV-2.4.7.1. Principio

Con este análisis se verifica todo el proceso Kjeldahl, para la determinación de nitrógeno en las muestras, incluyendo la digestión y la destilación.

El análisis consiste en la digestión y destilación de una muestra de acetanilida, con un volumen de nitrógeno previamente conocido. El proceso resulta correcto siempre y cuando la recuperación esté por encima del 99%.

IV-2.4.7.2. Preparación del blanco

Se pesan 0.3 g de acetanilida con una precisión de $\pm 0.1\text{mg}$ en papel libre de nitrógeno y se introducen en un tubo de digestión con 4 g del catalizador Kjeldahl, así como el volumen de ácido sulfúrico correspondiente y unos granos de piedra pómez tratada.

IV-2.4.7.3. Digestión, destilación, blanco y valoración

La digestión, destilación, blanco y valoración se hacen exactamente igual que en el método directo para la determinación de proteínas en las muestras.

IV-2.5. Preparación de muestras y patrones en la determinación de aminoácidos

La muestra (100 mg) consistente en el caparazón con su contenido, previamente secada y homogeneizada, se coloca en cada uno de los tubos con tapa de rosca (16 mm x 125 mm) y a continuación se adiciona el volumen de ácido clorhídrico correspondiente (6N, 10 ml) que contiene un 1% de fenol. Los tubos se cierran en atmósfera de nitrógeno, y se colocan en estufa durante 24 horas a 110 °C. Después de la hidrólisis, el contenido de los tubos se filtra a vacío a través de papel Whatman n° 41. El filtrado se diluye a 25 ml con agua ultra-pura en un matraz aforado de dicho volumen y 1 ml del líquido resultante se filtra a través de una membrana de tamaño de poro de 0.45 µm.

Se preparó también una solución patrón formada por 1.25 µmol/ml de cada aminoácido disueltos en ácido clorhídrico 0.1 N.

IV-2.6. Derivatización con PITC

El procedimiento de derivatización se basa en una modificación del método utilizado por González-Castro (González-Castro y col., 1997). La solución patrón de aminoácidos o la muestra hidrolizada (20 µl) se coloca en un vial y se seca en una estufa a vacío durante 2 horas y a una temperatura de 65 °C. A este residuo se le añaden 30 µl de metanol-agua-TEA (2:2:1) y la solución resultante se seca a vacío de nuevo durante 10 minutos a 65 °C. Se añaden 30 µl del reactivo de derivatización, metanol-agua-TEA-PITC (7:1:1:1 [v/v]), y los viales se agitan en el vortex durante 30 segundos y se dejan reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Finalmente, la solución resultante se seca a vacío durante 15 minutos a la temperatura inicial. Antes

de la inyección, se adicionan a cada vial 150 µl de una solución constituida por fosfato sódico 5 mM (Na_2HPO_4) con un 5% de acetonitrilo, ajustado a pH 7.43 con ácido fosfórico (H_3PO_4), y se lleva al vortex durante 15 segundos.

IV-2.7. Equipo de HPLC. Condiciones

La cromatografía líquida de alta resolución fue llevada a cabo con un cromatógrafo Spectra-Physics, siendo la fase móvil utilizada en gradiente y constituida por dos soluciones: la solución A, a partir de un tampón de acetato sódico 0.14 M conteniendo un 0.05% de TEA (v/v), a pH 6.2 con ácido acético glacial y la solución B acetonitrilo:agua en una proporción 60:40. La velocidad de flujo de 0.9 ml/min y la longitud de onda 254 nm. La temperatura de la columna se mantiene a 27 ± 0.1 °C. El gradiente de elución de la fase móvil se muestra en la siguiente Tabla IV-1.

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	% Solución A	% Solución B
0	0.9	90	10
8.0	0.9	90	10
10.0	0.9	70	30
14.0	0.9	70	30
20.0	0.9	52	48
22.0	0.9	0	100
25.0	0.9	0	100
28.0	0.9	90	10
35.0	0.9	90	10

Tabla IV-1: Condiciones de trabajo para la separación de aminoácidos.

IV-3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV-3.1. Contenido en proteínas

Se han realizado ensayos con las diferentes cantidades de muestra (2, 1, 0.5 y 0.3g), diferentes cantidades de catalizador Kjeldahl (8g = una pastilla y 4g = media pastilla), diferentes cantidades de ácido sulfúrico (25, 20 y 10 ml) y de hidróxido sódico (100, 75 y 50 ml). La concentración del ácido clorhídrico también se modificó desde 0,25 N a 0.1 N. Después de realizar diversos ensayos, los procesos óptimos de digestión y destilación se obtuvieron con 0.3 g de muestra, 4 g de catalizador Kjeldahl, 10 ml de ácido sulfúrico al 95-97%, 50 ml de hidróxido sódico al 35% y ácido clorhídrico 0.1N. El programa de digestión fue ensayado hasta obtener los resultados óptimos (30 minutos a 125 °C, 30 minutos a 200 °C y 120 minutos a 400 °C).

El contenido en proteínas osciló entre los 35.52 ± 3.16 g/100 g de m.s. encontrados en el caparazón y los 32.97 ± 13.76 g/100g de m.s. analizados en el caldo de los cangrejos estudiados en el 2003. El valor obtenido en el segundo año de estudio, 33.2 ± 2.4 g/100g de m.s., se aproximó a la media del valor del 2003.

Algunos autores analizan diferentes partes de la estructura del cangrejo para determinar su composición nutricional, lo que incluye a las proteínas, así Skonberg y Perkins, 2002 obtuvieron valores próximos a 17 g/100 g m.s. en pinzas y patas cocidas y crudas en el *green crab*; Gókoolu, y Yerlikaya, 2003 estudiaron los valores de proteínas en el *blue crab* y en el *swim crab* (pinzas y cuerpo) con valores cercanos a 15 y 22 g /100 g de m.s. respectivamente.

Con respecto al porcentaje de proteínas obtenido en diversos estudios, en el cangrejo de río Lovell y col., 1968 obtuvieron valores entre $32.2\% \pm 2.44$ y en el *green crab* (Naczki y col., 2004) los valores oscilaron entre 83.5%-80.6% y 7.06%-4.31% dependiendo de la parte analizada (carne y caparazón respectivamente) y del lugar de captura.

Si comparamos nuestros resultados con los datos presentes en FNIC (USDA, 2007) con respecto a cangrejos como Alaska king, Blue, Dungeness o Queen, todos ellos cocinados y para 100 g de porción comestible, observamos que los datos de proteínas son 86 g, 89.5 g, 83.6g y 95.3 g (expresados en materia seca) respectivamente, siendo por tanto cantidades superiores a las de nuestro cangrejo.

IV-3.2. Contenido en aminoácidos

En nuestro estudio se han determinado diecisiete aminoácidos, el tiempo de inyección fue de 35 minutos con un paso previo de derivatización que duró aproximadamente 180 minutos. En comparación con otros métodos de derivatización para el análisis de aminoácidos utilizando la técnica de HPLC, el reactivo de derivatización, PITC, requiere tiempos relativamente largos (Fabiani y col., 2002). Los ensayos indicaron que los aminoácidos derivatizados eran estables durante 48 horas bajo refrigeración. Los diferentes aminoácidos se identificaron por comparación de los tiempos de retención obtenidos a partir de soluciones patrón de aminoácidos. De los diecisiete aminoácidos investigados la hidroxiprolina no ha sido detectada.

Las ecuaciones de regresión para la calibración de cada aminoácido se encuentran en la Tabla IV-2; el rango de concentraciones utilizado fue de 24 y 260 mg/l para ambos años de estudio. La relación entre la concentración y

el área del pico fue siempre lineal, con coeficientes de correlación superiores a 0.9840.

AA	Recta 2003	R ² 2003	Recta 2005	R ² 2005	RT (min)
Asp	$y = 0.1153x + 0.5125$	0.9962	$Y = 0.0797x - 0.3$	0.9963	3.31
Glu	$y = 0.1259x - 0.125$	0.9999	$Y = 0.1082x + 0.15$	0.9842	3.85
Hyp	$y = 0.1465x + 0.35$	1	$Y = 0.1409x - 0.9$	0.9995	4.43
Ser	$y = 0.2022x - 0.1$	0.9975	$Y = 0.1479x - 0.95$	0.999	6.55
Gly	$y = 0.3057x + 1.2$	1	$Y = 0.261x - 1.95$	0.9972	7.38
His	$y = 0.0481x + 2.875$	0.9049	$Y = 0.049x + 0.3$	0.999	10.56
Arg	$y = 0.1027x - 0.175$	0.9842	$Y = 0.0305x + 1.5$	0.9871	11.04
Thr	$y = 0.2087x - 2.8375$	0.9984	$Y = 0.2828x - 4.15$	0.994	12.35
Ala	$y = 0.1885x - 1.75$	0.9957	$Y = 0.1519x + 0.4$	0.9958	12.97
Pro	$y = 0.2203x + 0.35$	0.998	$Y = 0.1714x - 1.9$	0.9998	13.50
Tyr	$y = 0.1244x - 0.525$	0.9997	$Y = 0.0791x - 1.65$	0.9966	16.75
Val	$y = 0.1793x + 0.1375$	0.9988	$Y = 0.1964x - 3.95$	0.992	17.07
Met	$y = 0.141x - 0.425$	1	$Y = 0.1218x - 3.8$	0.9887	18.29
Ileu	$y = 0.1497x - 0.675$	0.9995	$Y = 0.1739x - 5.8$	0.9851	20.67
Leu	$y = 0.1752x - 0.2625$	1	$Y = 0.1752x - 1.3$	0.9935	20.90
Phe	$y = 0.1225x + 0.4875$	0.9998	$Y = 0.1096x - 1.95$	0.9917	22.56
Lys	$y = 0.143x - 0.5625$	0.9891	$Y = 0.0744x - 1.05$	0.9999	24.15

Tabla IV-2: Rectas de regresión y tiempos de retención (RT) para los diferentes aminoácidos analizados

En nuestro estudio se han realizado ensayos con diferentes cantidades de muestra (50, 100 y 150 mg) y con diferentes cantidades de HCl 6 N (5, 10 y 15 ml), obteniéndose los mejores resultados para la hidrólisis con 100 mg de muestra y 10 ml de HCl 6 N, a una temperatura de 100 °C durante 24 horas, al igual que otros autores (González-Castro y col., 1997; Sánchez-Machado y col., 2003b).

También se probaron tampones como el acetato amónico y el acetato sódico y se investigó el efecto del cambio de pH (5.9, 6.2, 6.25 y 6.4) para la optimización de las condiciones de elución, seleccionándose el tampón de acetato sódico y pH 6.2 como las condiciones óptimas. La fase móvil se preparó con dos soluciones, A y B (tampón de acetato sódico y acetonitrilo:agua), para obtener una buena separación de la alanina (Ala) y prolina (Pro). Se ensayaron cambios en los gradientes, en el flujo (0.9; 1 y 1.1 ml/min) y en la temperatura de la columna (25 y 27 °C) obteniéndose resultados óptimos a 27 ± 0.1 °C y 0.9ml /min.

En la figura IV-4 se puede observar el cromatograma de una solución patrón y la Figura IV-5 el cromatograma obtenido de una muestra del cangrejo *Chionoecetes opilio*.

La Tabla IV-3, muestra las medias y desviaciones estándar (g/100g de m.s.) del contenido de aminoácidos para treinta muestras en el 2003 y cuarenta muestras en el 2005 del cangrejo de las nieves, analizadas por duplicado. Las cantidades más elevadas corresponden a la arginina, lisina, leucina, ácido glutámico y serina, siendo el total de aminoácidos un poco más elevado en las muestras correspondientes al muestreo del 2005.

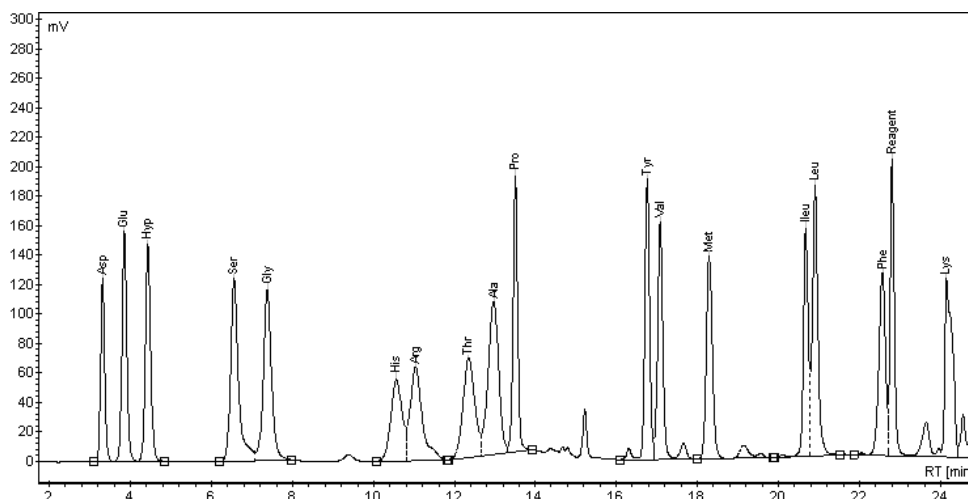


Figura IV-4: Cromatograma de un patrón de aminoácidos.

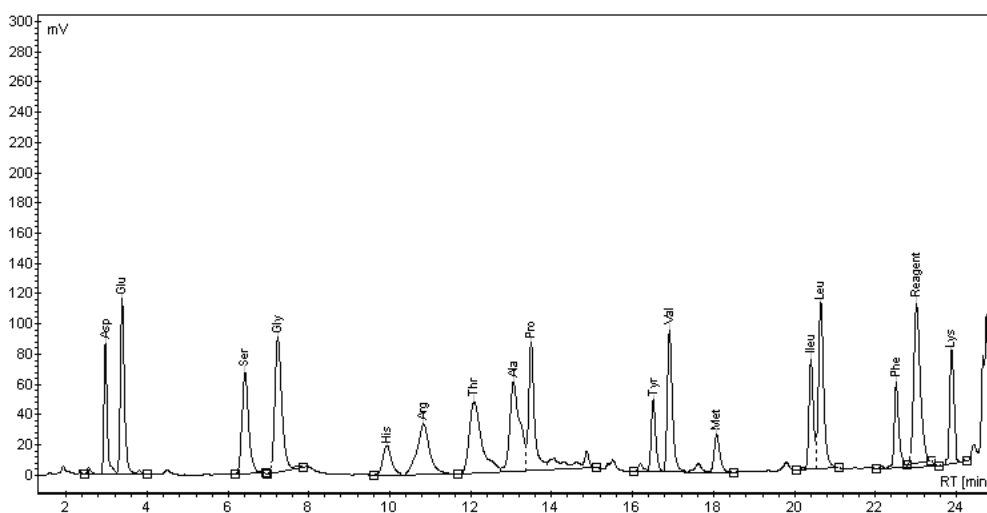


Figura IV-5: Cromatograma de aminoácidos de una muestra del cangrejo *Chionoecetes opilio* (caparazón y contenido).

Jaswal (1990) obtuvo resultados más elevados para la mayor parte de estos aminoácidos en el mismo tipo de cangrejo, sin embargo el procedimiento no ha sido descrito. El contenido de aminoácidos obtenido en el *green crab* (Naczki y col., 2004) fue menor que en el Cangrejo de las Nieves, aunque el análisis se refiere a la carne del cangrejo.

Si comparamos nuestros resultados con los datos presentes en FNIC (USDA, 2007) con respecto a cangrejos como Alaska king, Blue, Dungeness o Queen, todos ellos cocinados y para 100 g de porción comestible, observamos que los aminoácidos presentes en todos ellos son los mismos que los encontrados por nosotros, pero en proporciones más elevadas de acuerdo con el contenido en proteínas.

Aminoácido	Media ^a ±DS ^b 2003	Media ^a ±DS ^b 2005
Asp	1.23±0.43	1.82±0.14
Glu	1.97±0.48	2.3±0.09
Ser	1.64±0.26	1.58±0.18
Gly	1.30±0.28	1.48±0.09
His	1.45±0.25	1.37±0.15
Arg	2.35±0.54	2.44±0.88
Thr	1.58±0.44	1.29±0.18
Ala	1.46±0.35	1.30±0.08
Pro	0.91±0.29	0.91±0.04
Tyr	0.98±0.17	1.48±0.23
Val	1.38±0.24	1.60±0.04
Met	0.48±0.13	1.22±0.34
Ileu	0.96±0.27	1.73±0.44
Leu	1.58±0.3	3.2±0.10
Phe	1.3±0.29	1.02±0.03
Lys	2.07±0.76	1.93±0.08

Tabla IV-3: Contenido de aminoácidos (g/100 g m.s.) de los cangrejos analizados (caparazón y contenido del caparazón individual y conjuntamente) [Media g AA/100 g muestra seca-Desviación estándar].

Comparando los resultados obtenidos para el *Chionoecetes opilio* con otras especies marinas, como el erizo de mar, (De la Cruz-García y col., 2000), tanto para las muestras crudas como en conserva, podemos observar que el contenido en aminoácidos es del orden del doble que los resultados de nuestro estudio. Las muestras de cangrejo sólo presentan mayor contenido para tres aminoácidos (histidina, arginina y metionina) en el primer año de estudio, mientras que en el 2005 son más altos los contenidos de histidina, arginina, tirosina, metionina e isoleucina.

IV-4. CONCLUSIONES

El análisis de proteínas por el método Kjeldahl permite trabajar en condiciones apropiadas, hacer simultáneamente otros análisis y analizar varias muestras a la vez. Aunque la digestión de proteínas requiere casi tres horas de análisis, la destilación es muy rápida.

Se ha optimizado un método de HPLC para el análisis simultáneo de diecisiete aminoácidos en muestras de cangrejo mediante separación en fase reversa y detección UV previa derivatización con fenilisotiocianato.

Los resultados obtenidos indican contenidos altos en proteína, 35.52 g/100g m.s. y 32.97 g/100g m.s. en caparazón y contenido respectivamente, para el 2003; y una media de 33.2 g/100g m.s. para el 2005 y así como cantidades elevadas de aminoácidos, destacando la arginina, lisina, glutámico, serina y leucina, estando presentes todos los aminoácidos esenciales para el cultivo de peces.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Álvarez Aranguiz, A. (2006). Informe sobre le aprovechamiento del Cefalotórax de Cangrejo Rojo como ingrediente de dietas para especies acuáticas (<http://www.roxocanval.org/Doc/CangrejoRojo.pdf>).

Blakenship, D.T.; Krivanek, M.A.; Ackerman, B.L.; Cardin, A.D. (1989). High sensitivity amino acid analysis by derivatization with o-phthaldehyde and 9-fluorenylmethyl chloroformate using fluorescent detection: applications in protein structure determination. *Anal. Biochem.*, 178: 227-232.

Calull, M.; Fábregas, J.; Marcé, R.M.; Borrull, F. (1991). Determination of free amino acids by precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. Application to wine samples. *Chromatographia*, 31(5-6): 272-276.

De Barber, C.; Prieto, J.A.; Collar (1989). Reversed-phase high-performance liquid chromatography analysis of changes in free amino acids during wheat bread dough fermentation. *Cereal Chem.*, 66 (4): 283-288.

De la Cruz-García, C.; López-Hernández, J.; González-Castro, M.J.; Rodríguez-Bernaldo De Quirós, A.; Simal-Lozano, J. (2000). Protein, amino acid and fatty acid contents in raw and canned sea urchin (*Paracentrotus lividus*) harvested in Galicia (NW Spain). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1189-1192.

Dorresteyn, R.C.; Berwald, L.G.; Zomer, G.; De Gooijer, C. D.; Wieten, G.; Beuvery, E.C. (1996). Determination of amino acids using o-phthalaldehyde-2-

mercaptoethanol derivatization. Effect of reaction conditions. J. Chromatogr. A., 724: 159-167.

Einarsson, S.; Molestad, S.; Josefsson, B.; Lagerkvist, S (1986). High-resolution reversed phase liquid chromatography system for the analysis of complex solutions of primary and secondary amino acids. Anal. Chem., 58: 1638-1643.

Fabiani, A.; Versari, A.; Parpinello, GP.; Castellari, M.; Galassi, S. (2002). High-performance liquid chromatographic analysis of free amino acids in fruit juices using derivatization with 9-fluorenylmethyl-chloroformate. Journal of Chromatographic Science, 40 (1): 14-18.

Fierabracci, V.; Masiello, P.; Novelli, M.; Bergamini, E. (1991). Application of amino acid analysis by high-performance liquid chromatography with phenyl isothiocyanate derivatization to the rapid determination of free amino acids in biological samples. J. Chromatogr., 570: 285-291.

Godel, H.; Seitz, P.; Verhoef, M. (1992). "Automated amino acid análisis using combined OPA and FMOC-Cl precolumn derivatization". LC-GC Intl., 5: 44-49.

Gökoolu, N.; Yerlikaya, P. (2003). Determination of proximate composition and mineral contents of blue crab (*Callinectes sapidus*) and swim crab (*Portunus pelagicus*) caught off the Gulf of the Antalya. Food Chemistry, 80: 495-498.

González-Castro, M.J.; López-Hernández, J.; Simal-Lozano, J.; Oruña-Concha, M.J. (1997). Determination of amino acids in green beans by

derivatization with phenylisothiocyanate and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatographic Science*, 35: 181-185.

Heu, M.S.; Kim, J.S.; Shahidi, F. (2003). Components and nutritional quality of shrimp processing by-products. *Food Chemistry*, 82: 235-242.

Jaswal, A.S. (1990). Amino acid hydrolysate from Crab processing waste. *Journal of Food Science*, 55 (2): 379-380.

Leningher, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. (1993). "Principios de bioquímica". Ed. Omega, Barcelona. 2ª ed. Capítulo 5.

Lovell, R.T.; Lafleur, J.R.; Hoskins, F.H. (1968). Nutritional value of Freshwater Crayfish waste meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 16 (2): 204-207.

Mataix, J. (2002). Nutrición y alimentación humana. (I) Nutrientes y alimentos. Ed. Ergon. Madrid.

NAS/IOM/FNB. Dietary Reference Intakes for Amino Acides 2002/2005.
<http://www.nap.edu>

Naczk, M.; Williams, J.; Brennan, K.; Liyanapathirana, Ch.; Shahidi, F. (2004). Compositional characteristics of green crab (*Carcinus maenas*). *Food Chemistry*, 88: 429-434.

Nollet, L.M.L. (2000). "Food analysis by HPLC". Ed. Marcel Dekker, New York, 2ª ed. Capítulo 2.

Rajendra, (1987). High performance liquid chromatographic determination of amino acids in biological samples by precolumn derivatization with O-phthaldialdehyde. *Journal of liquid chromatography*, 10 (5):941-955.

Sánchez-Machado, D. I. Aplicación de técnicas cromatográficas (HPLC y CG) al estudio de nutrientes en algas comestibles procesadas. Tesis doctoral. Abril 2003 (a).

Sánchez-Machado, D.I.; López-Cervantes, J.; López-Hernández, J.; Paseiro-Losada, P.; Simal-Lozano, J. (2003) (b). High-Performance Liquid Chromatographic analysis of amino acids in edible seaweeds after derivatization with phenylisothiocyanate. *Chromatographia*, 58: 159-163.

Schuster, R. (1988). "Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr.*, 431: 271-284.

Senden, M.H.M.N.; Van der Meer, A.J.G.M.; Limborgh, J.; Wolterbeek, H.TH. (1992). "Analysis of major tomato xylem organic acids and PITC-derivatives of amino acids by RP-HPLC and UV detection". *Plant and Soil*, 142: 81-89.

Sherwood, R.A. (1990). "Amino acid measurement by high-performance liquid chromatography using electrochemical detection. *J. Neurosci. Methods*, 34: 17-22.

Skonberg, D.I.; Perkins, B.L. (2002). Nutrient composition of green crab (*Carcinus maenas*) leg meat and claw meat. *Food Chemistry*, 77: 401-404.

USDA, 2007 [Available: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/>]

Vázquez-Ortiz, F.A.; Caire, G.; Higuera-Ciapara, I.; Hernández, G. (1995). "High performance liquid chromatographic determination of free amino acids in shrimp. *J. Liquid Chromatogr.*, 18 (10): 2059-2068.

V- DETERMINACIÓN DE QUITINA

Parte de este trabajo se ha publicado:

"High-performance liquid chromatographic determination of chitin in the Snow crab, *Chionoecetes opilio*". Punín Crespo, M.O.; Vilasoa Martínez, M.; López Hernández, J.; Lage Yusty, M.A. (2006). *Journal Chromatography A*, 1116, 189-192.

Trabajo presentado como póster en:

Ninth International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography Hyphenated Chromatographic Analyzers (HTC-9) and Eighth International Symposium on Advances in Extraction Techniques, York, February 8th, 2006.

RESUMEN

Se desarrolló un método de HPLC para la determinación de glucosamina en los caparazones del cangrejo que puede utilizarse para estimar la cantidad de quitina. Las muestras del cangrejo se hidrolizaron con HCl 6 N a 100 °C durante 13 h y la glucosamina liberada se determinó por HPLC mediante un detector de índice de refracción (RI). Las separaciones se realizaron usando una columna ODS-2 con fase móvil isocrática consistente en 10% de metanol y 90% de hexanosulfonato a pH=2.1. La identificación de glucosamina, se llevó a cabo en base al tiempo de retención, y se confirmó mediante HPLC-MS.

V-1. INTRODUCCIÓN

La quitina es la sustancia orgánica más abundante en la naturaleza después de la celulosa, y, tal vez, la menos conocida. Es un biopolímero tipo polisacárido derivado de la celulosa, en el que el grupo hidroxilo del carbono 2 ha sido sustituido por el grupo acetamida y cuyo monómero es 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucosa (Parada y col., 2004). Forma una sustancia blanca, dura, inelástica, semitransparente y callosa, insoluble en agua y en la mayoría de los solventes (Figura V-I) (Krajewska, 2005). Se encuentra en la coraza de arácnidos, camarones, cangrejos y otros crustáceos, en el manto del plancton, incluyendo corales y medusas, en el exoesqueleto de los insectos y en el cartílago del calamar. Los insectos como las mariposas y las mariquitas tienen quitina en sus alas; así como las paredes de las células de la levadura, setas y otros hongos.

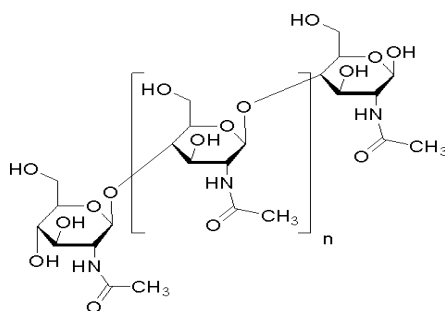


Figura V-1: Estructura molecular de la quitina (Sinónimo: Poly(*N*-acetil-1,4- β -D-glucopiranosamina); Fórmula molecular: $(C_8H_{13}NO_5)_n$; n° CAS: 1398-61-4)

Fue descubierta en 1811 por Henry Branconot y poco después en 1823, E. Odier continuó con su investigación. Sin embargo, ninguno alcanzó siquiera a imaginarse las asombrosas propiedades de esta sustancia y sus derivados ni el enorme espectro de sus aplicaciones. Sólo con el desarrollo de la química a principios del siglo XX, los químicos Emil Fischer (1903), Paul

Barrer (1929) y Walter Hawort (1939) lograron avanzar en la obtención de la quitina. Pero hasta finales del mismo siglo, a través de una intensa investigación científica sobre todo en Europa y en Japón, no se han logrado conocer a fondo las poderosas cualidades de la quitina y el quitosano (Hideo y Hoashi, 2003).

En los crustáceos se encuentra en la forma alfa con cadenas en direcciones alternas, que es la forma más estable debido a los enlaces de hidrógeno entre ellas. La rigidez del exoesqueleto de los crustáceos se debe a la inclusión de sales de calcio en los espacios existentes entre las fibras de quitina, a las que en ocasiones se adhieren algunas proteínas. Además, puede estar asociada a pigmentos del tipo cetocarotenoides (cantaxantina, astaxantina), también se encuentra formando parte de los recursos orgánicos renovables más abundantes en la naturaleza (Krajewska, 2005).

En la biomasa está estrechamente asociada con proteínas, minerales, lípidos y pigmentos, por lo que deben ser eliminados cuantitativamente con el fin de conseguir la pureza necesaria, para las aplicaciones biológicas (Percot y col., 2003).

La quitina es el principal precursor del quitosano, que se obtiene por modificación química mediante tratamiento con una solución alcalina concentrada y caliente (Parada y col., 2004). Tanto esta como sus derivados tienen una serie de propiedades que los hacen muy atractivos en nutrición, cosmética, biomedicina, agricultura y medio ambiente. Actualmente, se consume de forma habitual en todo el mundo como suplemento alimenticio. Sus propiedades antibacterianas y antivirales están muy indicadas para las aplicaciones de la medicina biológica, en la cura de heridas, suturas y como ayuda en las operaciones de cataratas y tratamiento de las enfermedades

periódicas. Los investigadores han podido comprobar que tanto la quitina como sus derivados no son tóxicos ni producen alergias, por lo que el organismo humano no produce ningún rechazo hacia estos componentes. La quitina además es totalmente biodegradable.

Cada vez se descubren nuevas ventajas, derivadas de sus aplicaciones como alimento funcional complementario. Se estima que el gran desarrollo y la rapidez con que se extiende y se acepta como dicho alimento funcional, hará pronto de él un alimento imprescindible en la dieta diaria de la mayor parte de la población humana.

El quitosano (Figura V-2) es insoluble en agua, pero se disuelve con facilidad en soluciones ácidas, lo que es debido a la presencia de grupos amino en su molécula (Krajewska, 2005). Esta solubilidad y su viscosidad (que puede hacerse más espesa o más ligera, según se requiera) son características que lo hacen aplicable a usos diversos. En el estómago humano, se une a grasas como el colesterol y los triglicéridos, que conduce por el intestino hasta su evacuación, así que una aplicación farmacéutica lo utiliza como regulador del peso corporal, mientras que también sirve como regulador de la presión arterial, consecuente a la disminución de absorción de grasas.

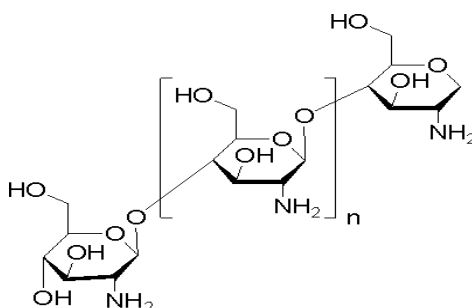


Figura V-2: Estructura molecular del quitosano (Sinónimos: 2-Amino-2-deoxy-(1→4)-β-D-glucopyranan, quitina deacetilada, Poly-(1→4)-β-D-glucosamina, Poly-(1,4-β-D-glucopiranosamina); Fórmula molecular: $(C_6H_{11}NO_4)_n$ n° CAS: 9012-76-4).

Para la determinación de quitina se usan técnicas de análisis de diferente tipo: enzimáticas, por digestión básica y ácida, ésta última puede ser mediante calcinación del residuo o determinando el nitrógeno del residuo (Calvo-Carrillo y col., 1995).

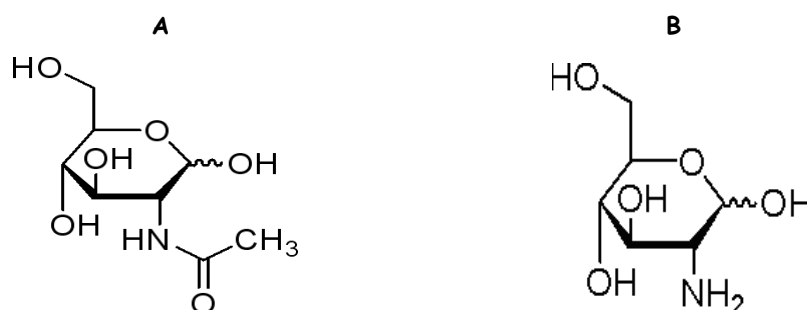


Figura V-3 (A y B): Estructura molecular de la N-acetil-D-glucosamina (sinónimos: 2-Acetamido-2-deoxy-D-glucosa, D-GlcNAc; Fórmula molecular: $C_8H_{15}NO_6$; n° CAS: 7512-17-6) y de la D-glucosamina (sinónimo: 2-Amino-2-deoxy-D-glucosa; Fórmula molecular: $C_6H_{13}NO_5$)

Químicamente, la quitina y el quitosano, son polisacáridos lineales que constan de unidades de N-acetil-D-glucosamina (Figura V-3A) y D-glucosamina (Figura V-3B) presentes en diferentes proporciones en los polímeros (Wu y col., 2004). La glucosamina es un amino-azúcar natural extraído de la quitina de la langosta de mar y de los caparazones de cangrejos. En combinación con el condroitín sulfato, puede establecer bloques de cartílago, regular la producción de condrocitos y reducir la degradación del cartílago (Shao y col., 2004). Debido a su efecto terapéutico en osteoartritis, la glucosamina puede emplearse como suplemento nutritivo (Sashiwa y col., 2003).

Los métodos para cuantificar la glucosamina han sido aplicados para determinar la composición analítica de los amino-azúcares. El uso de cromatografía de gases es muy sensible y tiene una elevada especificidad,

pero presenta limitaciones como consecuencia de las propiedades físico-químicas de la glucosamina (Shao y col.; 2004), y necesita un proceso de derivatización de los productos de la hidrólisis a compuestos volátiles. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) también incluye el problema de la derivatización (Appuhn y col.; 2004) si se utiliza un detector UV, sin embargo HPLC combinada con el detector índice de refracción (IR), muestra un gran potencial.

Los detectores índice de refracción son no-selectivos, y registran todas las sustancias con un IR que se diferencia de la fase móvil. Son generalmente menos sensibles que los detectores UV, pero pueden ser extremadamente útiles para detectar estos componentes que son no-iónicos, y no absorben en UV ni en fluorescencia (El-Saharty y Bary; 2002).

El objetivo de este estudio ha sido desarrollar y validar un método simple de HPLC-IR para la determinación de glucosamina en los caparazones del cangrejo *Chionoecetes opilio*, un importante subproducto que puede ser de gran interés para la acuicultura.

V-2. PARTE EXPERIMENTAL

V-2.1. Material y aparatos

- ❖ HPLC-RI: Cromatógrafo de líquidos formado por una bomba cuaternaria PV-1580 (Jasco, Tokio, Japón), loop de inyección de 20 μ l (Rheodyne, Cotati, CA, EE.UU.). Detector de Índice de Refracción Shodex RI-71. Columna Teknokroma ODS-2 de 25 cm x 0.4 cm d.i. y 5 μ m de tamaño de partícula. Termostatizador Spectra-Physics, modelo SP8792. Software Jasco ChromPass Chromatography Data System para Windows (versión 1.7.403.1).
- ❖ HPLC-MS: Cromatógrafo de líquidos Spectra Physics Series P200 (Termo Separations Products), equipado con loop de inyección de 50 μ l Rheodyne y un detector de masas VG Platform (Fisons Instruments) y software VG Mass Lynx, ver. 2.0. Columna NH₂ Teknokroma Tracer Extrasil de 25 x 0.4 cm d.i. y 5 μ m de tamaño de partícula.
- ❖ Filtros MFS-13, membrana PTFE (Tamaño de poro 0.45 μ m, diámetro de 13 mm). ADVANTEC MFS/Inc.
- ❖ Otro material de uso corriente en el laboratorio.

V-2.2. Patrones

- ❖ D(+)-Glucosamina clorhidrato. FLUKA.
- ❖ Quitina de caparazones de cangrejo. FLUKA.

V-2.3. Reactivos

- ❖ Ácido 1-Hexanosulfónico (sal sódica). SIGMA.
- ❖ Ácido Ortofosfórico al 85%. MERCK.
- ❖ Metanol. MERCK.

- ❖ Ácido clorhídrico fumante al 37%. MERCK.
- ❖ Acetonitrilo. MERCK.
- ❖ Fosfato potásico dihidrogenado. MERCK.
- ❖ Agua purificada, obtenida por ósmosis en un equipo MILLI-Q, MILLIPORE.
- ❖ Gases de la Sociedad Española de Oxígeno: Nitrógeno seco y Helio N-50.

V-2.4. Preparación de la fase móvil

La fase móvil utilizada en este estudio fue similar que la propuesta por Way y col., 2000. Aproximadamente 1.1 g de la sal sódica de hexanosulfonato se disuelve en 1000 ml de agua milli-Q. La solución se ajusta a pH 2.1 utilizando ácido orto-fosfórico. La fase móvil se prepara mezclando 900 ml de esta solución con 100 ml de metanol.

V-2.5. Preparación de los patrones

Se prepara una solución madre de 2 g/100 ml de clorhidrato de glucosamina en agua a partir de la cual se obtuvieron las soluciones de trabajo en un rango de concentraciones de 8 a 48 mg/100 ml. Posteriormente a 1 ml de estas soluciones se le adiciona 1 ml de HCl 12 N. Los tubos se colocan en un horno a 100 °C durante 13 horas. Transcurrido ese tiempo se dejan enfriar a temperatura ambiente y las soluciones se transfieren a un matraz aforado y se enrasa a 25 ml con agua mili-Q. Una alícuota de estas soluciones (1 ml) se filtró a través de una membrana de 0.45 µm de tamaño de poro.

A continuación se transfieren 200 µl de los patrones hidrolizados a viales y se secan en una estufa a vacío a 60 °C durante 75 minutos, se re-disuelven en 200 µl de fase móvil y se analizan por cromatografía.

V-2.6. Hidrólisis ácida de las muestras

Se pesan 100 mg de muestra de caparazón de cangrejo en un tubo Pyrex y se añaden 2 ml de HCl 6N, sometiéndose al mismo procedimiento de hidrólisis descrito previamente para los patrones.

V-2.7. Condiciones cromatográficas

V-2.7.1. HPLC-RI

El análisis cromatográfico se realiza con detector de índice de refracción. El flujo de la fase móvil es de 1.5 ml/min y el tiempo de análisis 15 minutos. La temperatura de la columna se mantiene a 35 °C.

La identificación de glucosamina se realiza mediante estándar externo, en base al tiempo de retención, y se confirma mediante cromatografía de masas.

V-2.7.2. HPLC-MS

Con el sistema HPLC-MS, formado por un cromatógrafo de líquidos Spectra Physics, se trabaja en modo Full Scan y la fase móvil es acetonitrilo:agua (30:70) a un flujo de 1 ml/min en modo isocrático. El detector opera bajo las siguientes condiciones:

- ❖ Presión atmosférica positiva con modo de ionización química (APCI+).
- ❖ Temperatura de la sonda: 300 °C.
- ❖ Temperatura de la fuente: 130 °C.
- ❖ Voltaje de cono: 20 V.
- ❖ Voltaje multiplicador de electrones: 700 V.
- ❖ Caudal del nitrógeno seco: 425 l/h.
- ❖ Caudal del nitrógeno en la sonda APCI: 175 l/h.

V-3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V-3.1. Optimización del método cromatográfico

En los diferentes análisis propuestos la columna más empleada es de grupos amino, debido a la interferencia del anión cloruro (Shao y col., 2004; Sashiwa y col., 2003; El-Saharty y Bary, 2002; Liang y col., 1999; Chang y col., 2000). Sin embargo, en nuestro estudio, la separación de la glucosamina del frente del solvente no ha sido posible al evaluar este tipo de columna, a pesar de probar fases móviles diferentes.

En este estudio, hemos utilizado un reactivo con un par aniónico en la fase móvil para interaccionar con la molécula de glucosamina cargada positivamente, lo que permite la separación con una ODS2 y un detector de índice de refracción, evitando así la necesidad de modificar el cromóforo de glucosamina (Way y col., 2000).

Durante el desarrollo del método se ensayaron diferentes condiciones cromatográficas para optimizar la fase móvil, el rango de flujo y la temperatura de la columna. Se probaron varias fases móviles, agua:metanol (9:1); acetonitrilo:agua (50:50); acetonitrilo:tampón fosfato (75:25, pH 7.50); KH_2PO_4 -tampón Na_2HPO_4 . Los mejores resultados se obtuvieron con 10% de metanol, 90% hexanosulfonato 0.05N y pH 2.1. También se probaron varios flujos, 1; 1.2 y 1.5 ml/min y la columna se termostató a varias temperaturas, 28; 30 y 35 °C. Se eligieron como condiciones óptimas finales 1.5 ml/min y 35 °C.

En HPLC-MS, se realizaron varios ensayos. Se seleccionó el modo "Full Scan" o barrido completo. Se probaron diferentes temperaturas de sonda (250, 300, 400 °C) y diferentes voltajes de cono (20, 30 V). La

respuesta óptima se obtuvo con 300°C y 20 V. La masa característica de la glucosamina (m/z) fue 180 correspondiéndose a su $[M]^+$ como se muestra en la Figura V-4.

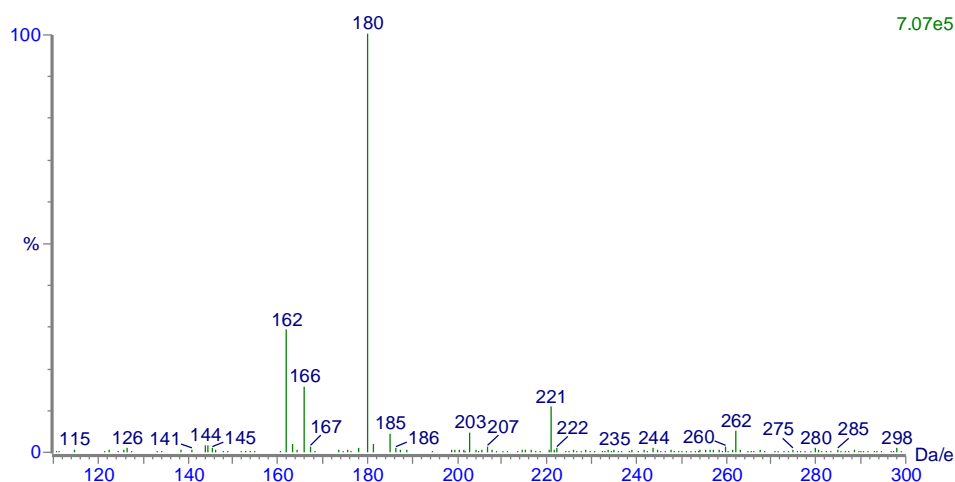


Figura V-4: Espectro de masas obtenido de una muestra de cangrejo.

V-3.2. Optimización de la hidrólisis

Durante la hidrólisis ácida, la temperatura, el tiempo y la concentración de HCl son los factores que influyen en la recuperación de la glucosamina. Un exceso de tratamiento ácido disminuye la recuperación (Cheng y Chiou, 1999). En este estudio se probaron diferentes cantidades de HCl, entre 1 y 15 ml para las muestras de cangrejo así como para los patrones de quitina y de glucosamina.

Para las muestras sólidas del caparazón del cangrejo, se necesitaron 2 ml de HCl 6 N para hidrolizar la muestra entera, mientras que para las soluciones patrón se usó 1 ml de HCl 12 N para mantener la misma concentración.

Con respecto al tiempo y a la temperatura de hidrólisis, los mejores resultados se obtuvieron a las 13 h y a los 100 °C.

V-3.3. Validación del método

Hay dos sales principales de glucosamina disponibles, las formas clorhidrato y sulfato. En el estudio presente se emplea la forma clorhidrato porque se libera más glucosamina relativa con respecto al peso de la sal.

Para calcular el porcentaje de glucosamina obtenido, debe tenerse en cuenta que 215 g de glucosamina - HCl equivalen a 179 g de glucosamina. Por tanto la hidrólisis de 221 g de quitina produce 179 g de glucosamina debido a la deacetilación de la molécula de quitina.

Las curvas de calibrado se realizaron usando soluciones diluidas en un rango de 8-48 mg de glucosamina-HCl en 100 ml. La pendiente obtenida fue 0.0518, el término independiente 0.0529 y el coeficiente de correlación 0.9939, para el año 2003, obteniéndose, una recta similar en el segundo año, verificándose así la linealidad.

El límite de detección (LOD) definido como tres veces la altura del nivel del ruido, es 1 mg/100 ml y se determinó según las directrices de la Sociedad Química Americana (ACS).

La precisión del método expresa el grado de concordancia entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones indicadas. Para evaluar la precisión del método, se realizaron seis determinaciones de la misma muestra el mismo día y usando el mismo procedimiento. Los resultados mostraron un promedio de

concentración de quitina en materia seca de 8.56 y RSD <3.1%, indicando una precisión buena.

La recuperación de los análisis se llevó a cabo usando el procedimiento de adición del patrón. Para ello se añadieron 9 mg de quitina comercial a 100 mg de ocho muestras de cangrejo, se hidrolizaron y a continuación se analizaron por HPLC-RI. La media de la recuperación obtenida fue 82.3, expresada en quitina (materia seca), con un RSD <6.25%.

V-3.4. Contenido de quitina de las muestras de cangrejo

Se han analizado por duplicado 32 muestras correspondientes al año 2003 y 40 muestras correspondientes al año 2005 de caparazón de cangrejo y la glucosamina liberada fue determinada por HPLC-RI. El porcentaje medio de quitina obtenido fue $5.57 \pm 2.9\%$ para el primer año y $8.04 \pm 2.07\%$ para el segundo. La figura V-5 muestra los cromatogramas de la glucosamina obtenida del patrón de quitina (A) y de las muestras de caparazón de cangrejo por hidrólisis ácida (B).

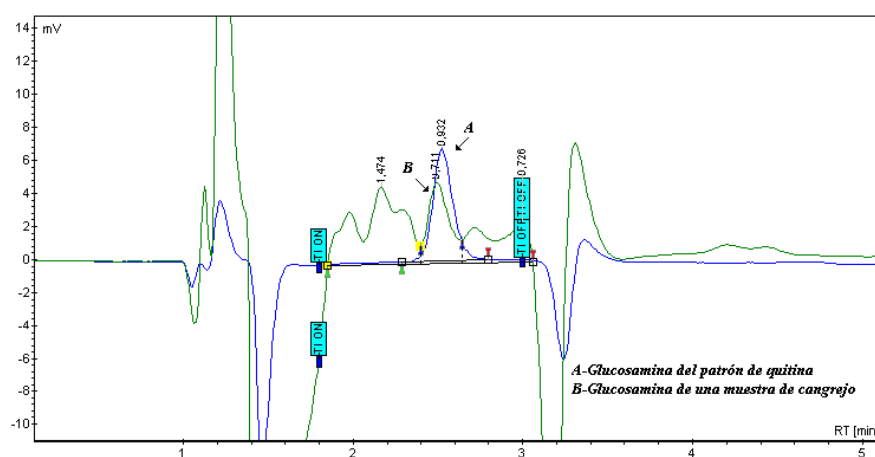


Figura V-5: Cromatograma del patrón de glucosamina (A) y de los caparazones de cangrejo por hidrólisis ácida (B).

La información publicada con respecto a la determinación de quitina en las especies del cangrejo es limitada. Uno de los pocos estudios disponibles es el de Naczk (Naczk y col., 1981 y 2004) en el cangrejo verde *Carcinus maenas*. Empleando un procedimiento químico para la extracción de la quitina en el caparazón de este cangrejo, estos autores obtuvieron un porcentaje medio de 12.6-14.5%. Para comparar estos resultados con los obtenidos con nuestro método, decidimos aplicar el procedimiento de Naczk a nuestras muestras. Para ello diez muestras de *Chionoecetes opilio* se sometieron a este procedimiento, obteniéndose un porcentaje medio del 17%.

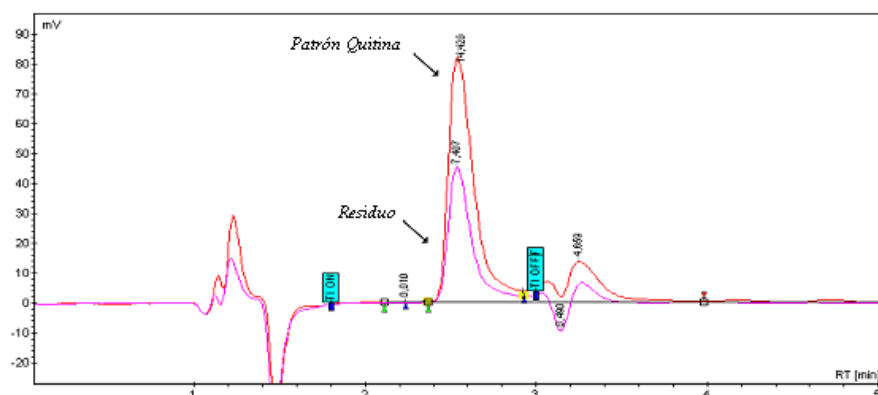


Figura V-6: Cromatograma superpuesto del residuo obtenido y del patrón de quitina comercial

Se parte de 2 g de muestra con 20 ml de KOH 5% y se mantiene en estufa durante 2 h a 100 °C. Transcurrido ese tiempo se deja enfriar y se filtra, adicionando agua destilada hasta alcanzar pH neutro. A continuación se lava con tres porciones de acetona de 25 ml. Se mete en estufa a 105 °C, hasta peso constante. Se obtienen alrededor de 0.7 g de residuo, de los cuales se toman 0.5 g. Se le añade 20 ml de HCl 5 % y se deja 2 h a temperatura ambiente. Se filtra de nuevo a vacío, lavando con agua destilada hasta alcanzar el pH deseado, con las tres porciones de acetona. Se

introduce en estufa a 105 °C durante 2 h más (peso constante). Así se obtiene la cantidad final de quitina total (aproximadamente 170 mg).

Finalmente, esa cantidad de quitina total (170 mg) y la misma cantidad de patrón de quitina comercial se extrajeron utilizando nuestro método, hidrolizando con 2 ml de HCl 6 N y analizando por HPLC-RI. Se observó que la quitina patrón presenta un pico con un área que duplica al área de la quitina extraída (Figura V-6). Estos resultados sugirieron que otros componentes diferentes a la quitina pueden estar presentes en el residuo obtenido usando el procedimiento de Naczki.

V-4. CONCLUSIONES

La cantidad de quitina en las muestras analizadas se determina en forma de glucosamina tras hidrólisis previa con HCl. En el presente estudio, se aplica un procedimiento de hidrólisis ácida simple y un método de HPLC con el detector de índice de refracción (RI) para el análisis de la quitina en los caparazones del cangrejo. El detector RI ha demostrado ser sumamente útil para la detección de este tipo de compuestos no-iónicos, eliminando el proceso de derivatización. El uso de un reactivo con par aniónico en la fase móvil que interacciona con la carga positiva de la molécula de glucosamina permite la separación con una columna OSD2.

Por tanto, los resultados de quitina encontrados varían en los dos años de muestreo, siendo el primer año de 5.57 g/100g m.s. y el segundo de 8.04 g/100 g m.s.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Chemical Society (ACS) (1980). Subcommittee of Environmental Analytical Chemistry, *Anal. Chem.*, 52: 271.

Appuhn, A.; Joergensen, R.G.; Raubuch, M.; Scheller, E.; Wilke, B. (2004). The automated determination of glucosamine, galactosamine, muramic acid, and mannosamine in soil and root hydrolysates by HPLC. *J. Plant. Nutr. Soil Sci.*, 167: 17-21.

Calvo-Carrillo, M.C.; Castro-González, M.I.; Sánchezarmas-Luna, R.; Pérez-Gil-Romo, F. (1995). Fibra cruda y quitina en el crustáceo Langostilla (*Pleuroncodes planipes*, Stimpson): similitudes y diferencias. *Ciencias Marinas*, 21 (2): 179-186.

Chang, K.L.B.; Lee, J.; Fu, W.R. (2000). HPLC Analysis of N-acetyl-chito-oligosaccharides during the Acid Hydrolysis of Chitin. *Journal of Food and Drug Analysis*, 8 (2): 75-83.

Cheng, W.; Chiou, R.Y.-Y. (1999). A modified chemical procedure for rapid determination of glucosamine and its application for estimation of mold growth in peanut kernels and koji. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 1999-2004.

El-Saharty, Y.; Bary, A.A. (2002). High-performance liquid chromatographic determination of nutraceuticals, glucosamine sulphate and chitosan, in raw materials and dosage forms. *Analytica Chimica Acta*, 462: 125-131.

Hideo, K.; Hoashi, N. (2003). EVVEN C.A. Novel development Project on Margarita Island, Venezuela. EVVEN (Equipo de Valor de Venezuela) C.A.

[http://www.evven.netfirms.com/\(2003\)](http://www.evven.netfirms.com/(2003)).

<http://www.evven.netfirms.com/text/chitinyquitosan.htm>

Krajewska, B. (2005). Membrane-based processes performed with use of chitin/chitosan materials. *Separation and Purification Technology*, 41: 305-312.

Liang, Z.; Leslie, J.; Adebawale, A.; Ashraf, M.; Eddington, N.D. (1999). Determination of the nutraceutical, glucosamine hydrochloride, in raw materials, dosage forms and plasma using pre-column derivatization with ultraviolet HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 20: 807-814.

Naczki, M.; Synowiecki, J.; Sikorski, Z.E. (1981). The gross chemical composition of Antarctic krill shell waste. *Food Chemistry*, 7: 175.

Naczki, M.; Williams, J.; Brennan, K.; Liyanapathirana, C.; Shahidi, F. (2004). Compositional characteristics of *green crab (Carcinus maenas)*. *Food Chemistry*, 88: 429-434.

Parada, L.G.; Crespín, G.D.; Miranda, R.; Katime, I. (2004). Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 5 (1): 1-16.

Percot, A.; Viton, C.; Domard, A. (2003). Optimization of chitin extraction from shrimp shells. *Biomacromolecules*, 4: 12-18.

Sashiwa, H.; Fujishima, S.; Yamano, N.; Kawasaki, N.; Nakayama, A.; Muraki, E.; Sukwattanasinitt, M.; Pichyangkura, R.; Aiba, S. (2003). Enzymatic production of N-acetyl-D-glucosamine from chitin. Degradation study of N-acetylchitooligosaccharide and the effect of mixing of crude enzymes. *Carbohydrate Polymers*, 51: 391-395.

Shao, Y.; Alluri, R.; Mummert, M.; Koetter, U.; Lech, S. (2004). A stability-indicating HPLC method for the determination of glucosamine in pharmaceutical formulations. *Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35: 625-631.

Way, W.K.; Gibson, K.G.; Breite, A.G. (2000). Determination of glucosamine in nutritional supplements by reversed-phase ion-pairing HPLC. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 23 (18): 2861-2871.

Wu, T.; Zivanovic, S.; Draughon, F.A.; Sams, C.E. (2004). Chitin and chitosan-value added products from mushroom waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 7905-7910.

VI- DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS Y LÍPIDOS TOTALES

Trabajo presentado como póster en:

* 3rd International Symposium on Recent Advances in Food Analysis". Prague, Czech Republic, November 7-9, 2007.

RESUMEN

Se evaluaron y se compararon tres métodos (Soxhlet, Bligh & Dyer y Extracción con Fluidos Supercríticos) para determinar el contenido en lípidos totales en los caparazones del cangrejo *Chionoecetes opilio*. Se optimizaron varios parámetros para conseguir una máxima eficacia de extracción. La cantidad de grasa encontrada es elevada con un valor medio de 10.17 g/100g m.s. el primer año y casi el doble, 21.9 g/100g m.s. el segundo año.

El perfil de los ácidos grasos se determinó por cromatografía de gases con detector de ionización de llama previa metilación en la fase de extracción. Como técnica de confirmación se empleó el GC-MS.

Se identificaron veintiún ácidos grasos, y como se esperaba, se detectó un elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados ω -3, 35.89% del contenido total de ácidos grasos.

VI-1. INTRODUCCIÓN

Las especies marinas son una de las fuentes principales de ácidos grasos ω -3. En los últimos años, la utilización de los derivados de pesca como alimento en las piscifactorías ha destacado en la industria de la acuicultura.

Se han descrito varios procedimientos de extracción de lípidos totales (Soxhlet, Bligh & Dyer, Rose-Gottlieb, etc.) en bibliografía (Manirakiza y col., 2001; Honeycutt y col 1995; Booij y Van den Berg, 1994), no existiendo ninguna opinión unánime del más conveniente. Estas técnicas consumen tiempo, son laboriosas y además requieren el uso de grandes cantidades de solventes tóxicos. Con el objetivo de superar estas desventajas se han propuesto varios estudios para utilizar solventes menos tóxicos (Gunnlaugsdottir y Aceman, 1993; Undeland, 1998). Más recientemente, la extracción con fluidos supercríticos (SFE) ha atraído el interés de los científicos como una alternativa a las técnicas convencionales.

El estudio del contenido de grasa total y la composición de ácidos grasos, especialmente ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) y ω -3 en productos marinos son de gran interés debido a sus efectos beneficiosos a nivel coronario. La técnica que normalmente se utiliza para el análisis de ácidos grasos es la cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización de llama (GC-FID).

En el presente estudio, se ensayaron tres métodos (Soxhlet, Bligh & Dyer y extracción con fluidos Supercríticos) para determinar el contenido de grasa total. Se optimizaron diferentes parámetros para conseguir una eficacia de extracción máxima. En la segunda parte del trabajo se determinó el perfil de los ésteres metílicos de los ácidos grasos usando un

procedimiento de metilación en la fase de extracción. Como técnica de confirmación se utilizó el GC-MS.

VI-2. PARTE EXPERIMENTAL

VI-2.1. Material y aparatos

- ❖ Cromatógrafo de gases Fisons GC-8000, equipado con inyector split-splitless. Detector de ionización de llama (FID) Fisons EL-980. Columna capilar DB-Wax de 60m × 0.32 mm d.i. × 0.25 µm de tamaño de partícula (con película de polietilenglicol) de J&W Scientific. Software Chrom-Card versión 1.18.
- ❖ Extractor de fluidos supercríticos Hewlett-Packard modelo HP 7680A (SFE).
- ❖ Centrífuga Ettich Eba 12.
- ❖ Vortex Stuart Scientific SA 6.
- ❖ Soxhlet. AFORA.
- ❖ Refrigerantes. AFORA.
- ❖ Cartuchos (33 mm× 118 ml). WHATMAN.
- ❖ Placas calefactoras. P-SELECTA.
- ❖ Rotavapor. SELECTA TECTRON 3473100.
- ❖ Baño de agua. P-SELECTA UNITRONIC.
- ❖ Otro material de laboratorio.

VI-2.2. Patrones

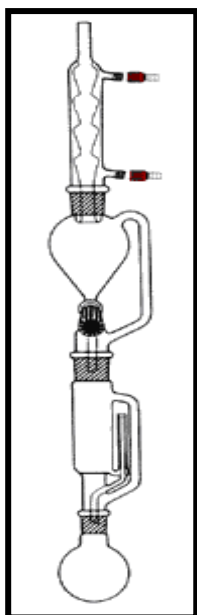
- ❖ Mezcla de ésteres metílicos de los ácidos grasos (PUFA N° 3). SUPELCO.
- ❖ Cis-11, 14-ácido eicosadienoico (éster metílico). SUPELCO.
- ❖ Cis-8, 11, 14-ácido eicosatrienoico (éster metílico). SUPELCO.
- ❖ Cis-11, 14, 17-ácido eicosatrienoico (éster metílico). SUPELCO.

VI-2.3. Reactivos (Todos los reactivos fueron de grado analítico)

- ❖ Arena. PROLABO.
- ❖ Cloroformo. MERCK.
- ❖ Metanol. MERCK.
- ❖ K_2CO_3 . MERCK
- ❖ Bencina de petróleo. MERCK.
- ❖ HCl. MERCK.
- ❖ N-hexano. MERCK.
- ❖ Tolueno. SIGMA-ALDRICH.
- ❖ Agua ultrapura. Se obtuvo de un sistema purificador de agua Milli-Q (Millipore).
- ❖ Gases de la Sociedad Española de Oxígeno: Helio N-50, Aire e Hidrógeno.

VI-2.4. Extracción de lípidos

Los procedimientos de extracción que se han estudiado son los siguientes



VI-2.4.1. Extracción por Soxhlet (Figura VI-1): En los cartuchos de extracción se pone 1 g de muestra seca homogeneizada mezclada con 10 g de arena y como solvente de extracción bencina de petróleo, la extracción se realiza durante 7 h. Transcurrido ese tiempo se pasa el contenido de cada matraz a un balón previamente tarado y pesado, llevándose a cabo la evaporación del solvente en rotavapor con ayuda de un baño de agua a una temperatura de 35 °C. Se seca el residuo resultante en estufa a 75°C durante 45 minutos y se determina gravimétricamente el contenido de lípidos.

Figura VI-1: Dispositivo de extracción por Soxhlet.

VI-2.4.2. Extracción de Bligh & Dyer modificada: Se parte de 0.5 g de muestra seca homogeneizada, se añade 1 ml de metanol y 0.5 ml de cloroformo. Se mezcla en vortex durante 2 minutos y se adicionan 0.5 ml de agua milli-Q. Se mezcla de nuevo 30 segundos y se filtra a través de papel Whatman N° 41. Se vuelve a extraer con el mismo volumen de cloroformo, agitando 2 minutos más y se filtra de nuevo. Los filtrados obtenidos se mezclan y se evaporan a sequedad bajo atmósfera de nitrógeno. La determinación del contenido de lípidos se hace por gravimetría.

VI-2.4.3. Extracción con fluidos supercríticos: Se introducen en el thimble o vaso de extracción de 7.0 ml, 0.5 g de muestra seca homogeneizada, 1g de tierra de diatomeas activada al 10% como adsorbente y 200 µl (0.2 ml) de metanol como modificador, colocando en cada extremo del vaso una circunferencia de papel de filtro Whatman 541, ajustados a su diámetro interno. Se procede a la extracción con un periodo inicial de 10 minutos a 50 °C seguido de un tiempo de extracción dinámica de 60 minutos a un flujo de CO₂ supercrítico de 4.0 ml/min, densidad 0.90 g/ml. y 350 bares de presión. La temperatura del restrictor fue de 55 °C, la columna usada fue ODS a 50 °C. Los lípidos fueron eluidos con 7.5 ml de bencina de petróleo. Se evapora el solvente en un rotavapor y se seca el residuo en estufa a 70 °C durante 45 minutos. Se determina el contenido de lípidos por gravimetría.

VI-2.5. Análisis de ácidos grasos con GC-FID

Las muestras se procesaron utilizando un procedimiento de extracción que incluye un solo paso de extracción-metilación. (De la Cruz García y col., 2000).

La muestra (400 mg) se coloca en cada uno de los tubos con tapa de rosca y se adiciona el volumen de tolueno (2 ml) y clorhídrico metanólico al 5 % (3 ml) correspondiente. Se cierra en atmósfera de nitrógeno y se coloca en un baño a 70 °C durante 2 horas. Transcurrido ese tiempo se deja enfriar y se mezcla en el vortex. Se añaden 5 ml de K₂CO₃ al 6% y 1 ml de tolueno. Se mezcla de nuevo. A continuación se centrifuga durante 5-10 minutos a 1100 r.p.m. y se recoge el sobrenadante. Se adiciona una punta de espátula de Na₂SO₄ y se filtra un determinado volumen a viales.

El análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se realizó mediante cromatografía de gases con FID.

Las condiciones de trabajo son las siguientes: temperatura del inyector 240 °C; temperatura del detector de ionización de llama 260 °C. La temperatura inicial de la rampa se fijó durante 1 minuto a 160 °C, a continuación sube a razón de 3.5 °C/min hasta 230 °C manteniéndose a esta temperatura 20 min. El gas portador fue helio con un flujo de 1.35 ml/min. La inyección se realizó en modo split-splitless con una proporción de 1:15. La cantidad de muestra inyectada fue de 1 µl. La presión en cabeza de columna 15 psi. Velocidad lineal media 22.76 cm/seg. Los flujos de hidrógeno y de aire 25 y 350 ml/min respectivamente.

El procesado de datos se realizó con el software Chrom-card para Windows (versión 1.18).

VI-2.6. Análisis de ácidos grasos con GC-MS

Se utilizó un detector de espectrometría de masas MD 800 (Fisons, Manchester, UK) acoplado a un cromatógrafo de gases. Las condiciones de trabajo fueron las siguientes: voltaje de la ionización, 70 eV; rango de masas

50-450 m/z y tiempos de scan e inter-scan de 0.45 s y 0.05 s, respectivamente. El programa de temperaturas del horno fue igual que para GC-FID.

El software utilizado fue el Masslab (Versión 1.4). Los compuestos se identificaron por la comparación de sus espectros de masas con los espectros de masas de la librería Wiley (versión 1.4), así como con el tiempo de retención de un patrón inyectado bajo las mismas condiciones.

VI-3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI-3.1. Lípidos totales

Para la selección de la fase orgánica, que es un paso crítico en la extracción con Soxhlet, se probaron diferentes solventes orgánicos: hexano, diclorometano y bencina de petróleo. Los mejores resultados se obtuvieron con la bencina de petróleo. El rendimiento de lípidos totales obtenido fue más elevado que los obtenidos con otros solventes. Además el paso de evaporación fue más corto debido al punto de ebullición más bajo. Por consiguiente la bencina de petróleo se eligió para la extracción de lípidos totales con Soxhlet. Katikou y Robb (Katikou y Robb, 2001) utilizaron el mismo solvente para extraer la grasa de muestras de salmones.

También se probó la extracción con fluidos supercríticos (SFE), como una alternativa a las técnicas convencionales. El metanol se utilizó como modificador para incrementar la solubilidad del CO_2 . Presiones elevadas mejoran la extracción, utilizando 350 bares con una temperatura de 50°C en la cámara de extracción y 0.90 g/ml de densidad de CO_2 . Una vez fijadas estas condiciones, se realizaron una serie de ensayos para optimizar otras variables. Se utilizaron cantidades diferentes de muestra, 0.5 y 1 g, se investigaron dos matrices inertes, tierra de diatomeas y sílica activada. El rango de flujo estudiado del CO_2 osciló entre 2 y 4 ml/min. La cantidad más elevada de grasa se extrajo con 0.5 g de muestra, tierra de diatomeas y un flujo de 4 ml/min, sin embargo, fue siempre más baja que la obtenida con los otros métodos.

El Soxhlet mostró una eficacia de extracción más elevada comparada con el método de Bligh & Dyer modificado, lo que podría ser debido a la

temperatura y a la mayor cantidad y continuo contacto del solvente con la muestra, que ha sido puntualizado previamente por Manirakiza y col. (Manirakiza y col., 2001).

El método seleccionado por tanto para el análisis de lípidos totales fue el Soxhlet y el resultado medio obtenido expresado en g/100 g m.s. para 30 muestras capturadas en el año 2003 fue de 10.17 ± 5.4 y para 40 muestras capturadas el año 2005 de 21.9 ± 8.4 .

VI-3.2. Ácidos grasos

En la segunda parte del trabajo se determinó el perfil de los ésteres metílicos de ácidos grasos. Aunque hay varios estudios de la composición de ácidos grasos de diferentes especies de cangrejos (Chen y col., 2007; Çelik y col., 2004) no se dispone de información sobre el contenido de ácidos grasos en caparazones de cangrejos.

Se seleccionó un procedimiento de extracción-metilación, debido a sus ventajas como, rapidez, simplicidad, bajo coste (Sanches-Silva y col., 2003; Sanches-Silva y col., 2004).

Cromatogramas de una solución patrón de los ésteres metílicos de los ácidos grasos analizados y de una muestra se recogen en las figuras VI-2 y VI-3 respectivamente.

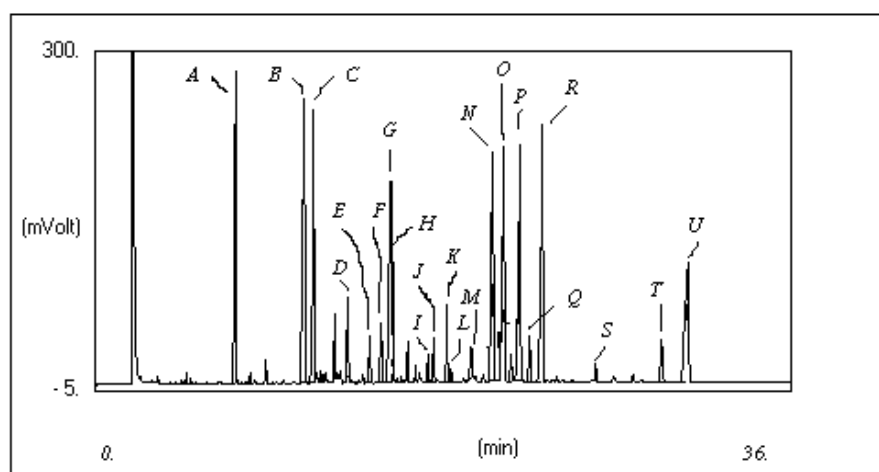


Figura VI-2: Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos de una solución patrón [A- C14:0, B- C16:0, C- C16:1n7, D- C16:2n4, E- C18:0, F- C18:1n9, G- C18: 1n7, H- C18:2n6, I- C18:3n4, J- C18:3n3, K- C18:4n3, L- C20:0, M- C20:1n9, N- C20:2, O- C20:4n6, P- C20:3, Q- C20:4n3, R- C20:5n3, S- C22:0, T- C22:5n3, U- C22:6n3].

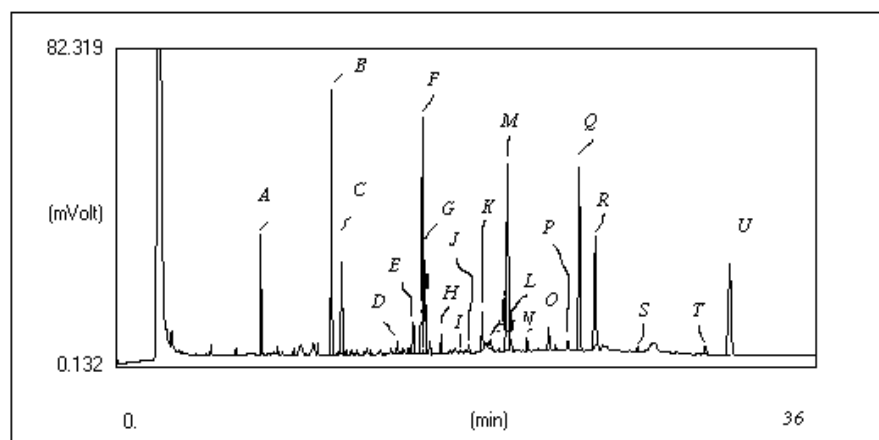


Figura VI-3: Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos de una muestra de cangrejo. [A- C14:0, B- C16:0, C- C16:1n7, D- C16:2n4, E C18:0, F- C18:1n9, G- C18: 1n7, H- C18:2n6, I- C18:3n4, J- C18:3n3, K- C18:4n3, L- C20:0, M- C20:1n9, N- C20:2, O- C20:4n6, P- C20:3, Q- C20:4n3, R- C20:5n3, S- C22:0, T- C22:5n3, U- C22:6n3].

La identificación de ácidos grasos se llevó a cabo mediante la comparación del tiempo de retención de los ésteres metílicos de los ácidos grasos obtenidos con una solución patrón y los obtenidos en las muestras y se confirmó por HPLC-MS.

Los espectros de GS-MS se muestran en la Figura VI-4. El programa de temperatura del horno fue el mismo que para el sistema de GC-FID descrito en la parte experimental. Como ejemplos de espectros de GS-MS se muestran los correspondientes al C:16, C18:1 ω 9 y C:20 4 ω 3.

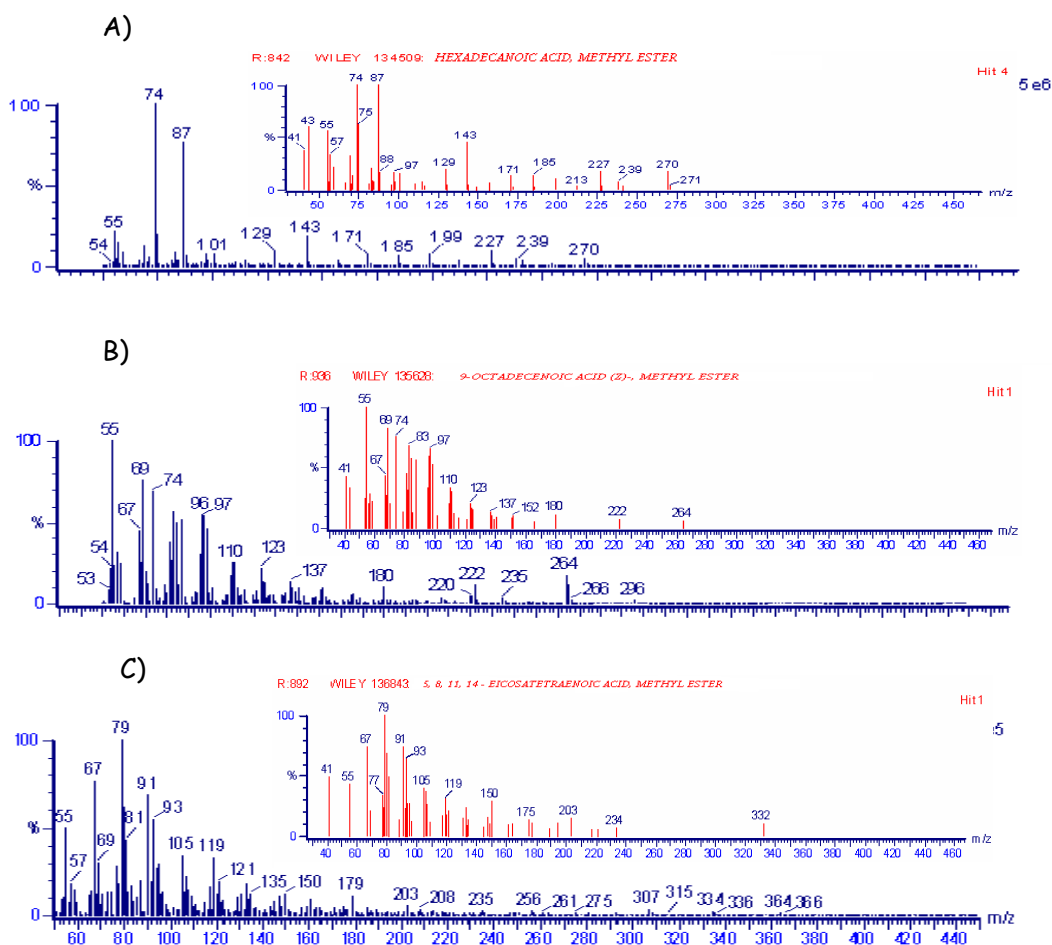


Figura VI-4: Espectros de GS-MS de C:16 (A), C18:1 ω 9 (B) y C:20 4 ω 3 (C).

La Tabla VI-1 muestra el perfil promedio de los ácidos grasos encontrados en las muestras. Se han determinado similares proporciones de ácidos grasos poliinsaturados y de ácidos grasos monoinsaturados. El porcentaje más bajo corresponde a los ácidos grasos saturados (Tabla VI-2, Figura VI-5).

ÁCIDO GRASO	PROMEDIO 2003-2005
C14:0	3.89
C16:0	13.80
C16:1n7	6.48
C16:2n4	0.71
C18:0	2.92
C18:1n9	14.88
C18:1n7	7.44
C18:2n6	1.08
C18:3n4	0.15
C18:3n3	0.51
C18:4n3	1.37
C20:0	0.87
C20:1n9	9.58
C20:2 (11, 14)	2.09
C20:4n6	0.92
C20:3 (11, 14, 17)	1.33
C20:4n3	9.45
C20:5n3	10.79
C22:0	1.88
C22:5n3	1.13
C22:6n3	8.75

Tabla VI-1: Promedio de porcentajes de ácidos grasos

PORCENTAJES RELATIVOS DE ÁCIDOS GRASOS IDENTIFICADOS	AÑO 2003	AÑO 2005
Ácidos grasos saturados	25.8±5.2	20.96±1,6
Ácidos grasos monoinsaturados	37.54±4.4	39.22±3.4
PUFAs	36.73±3.5	39.82±2.9
PUFAs ω6	1.51±0.37	2.47±0.68
PUFAs ω3	28.6±4.3	35.38±2.64
Relación ω6/ω3	0.05	0.07

Tabla VI-2: Porcentajes relativos de ácidos grasos identificados.

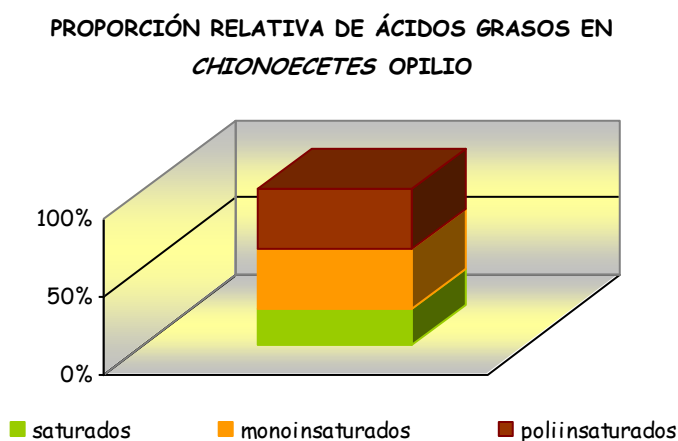


Figura VI-5: Proporción relativa de ácidos grasos del caparazón de cangrejo del *Chionoecetes opilio*

El ácido graso mayoritario de los saturados es el ácido palmítico C16:0, que contribuye con más del 50% del total (13.80%), este resultado está en concordancia con los encontrados en subproductos de camarones (Shahidi y Synowiecki, 1991; Heu y col., 2003) y en carne de cangrejo (Celik y col., 2004; Naczky y col., 2004; Chen y col., 2007). El ácido oleico C18:1ω9 (14.88 %) y el ácido eicosaenoico C20:1ω9 (9.58 %) son los ácidos grasos

monoinsaturados dominantes (Shahidi y Synowiecki, 1991; Heu y col., 2003; Celik y col., 2004; Naczek y col., 2004; Chen y col., 2007).

El perfil mayoritario de los ácidos grasos de los lípidos de los caparazones del *Chionoecetes opilio* corresponde a los ácidos grasos poliinsaturados, especialmente ω_3 (38.27 %), con un 10.79 % de ácido eicosapentaenoico (EPA), un 8.75 % de ácido docosahexaenoico (DHA) y un 9.45 % de ácido eicosatetraenoico. La relación entre ω_6/ω_3 es de 0.06; en subproductos de camarones (Heu y col., 2003) el contenido en EPA y DHA es similar, pero es más elevado el contenido en ω_6 , mientras que en la carne de cangrejo el porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) es menor, dominando también el EPA y DHA, pero la relación ω_6/ω_3 es más elevada (Celik y col., 2004; Chen y col., 2007). En el *green crab* (Naczek y col., 2004) se encuentran proporciones similares de ω_3 , y la relación ω_6/ω_3 es 0.22.

La cantidad de lípidos presente en los caparazones del *Chionoecetes opilio* es alta y tiene una buena digestibilidad y elevado valor nutritivo, lo que le confiere una potencial importancia en la alimentación de peces, -como el rodaballo (*Scophthalmus maximus*), el salmón (*Salmo salar*), la lubina (*Dicentrarchus labrax*) o la dorada (*Sparus aurata*) y otros-, incapaces de sintetizar ácidos grasos poliinsaturados y dependientes, principalmente durante sus fases larvarias, de su contribución en la dieta para su supervivencia (Bransden y col., 2005; El-Sayed y col., 2005; Li y col., 2005; Álvarez-Aranguiz, 2007). Alimentos enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados ω_3 pueden contribuir de manera importante al incremento de estos ácidos grasos en la dieta (Lane y col., 2006; Manning y col., 2006).

VI-4. CONCLUSIONES

El contenido de lípidos de las dietas es un factor fundamental en los piensos destinados a especies acuáticas. Éstos tendrán la función de productos energéticos para su utilización metabólica de desgaste energético. Un nivel lipídico elevado, dependiendo de las especies y condiciones de cultivo, sirve para ahorrar al máximo la proteína y obtener excelentes crecimientos.

La composición de ácidos grasos en las dietas, especialmente poliinsaturados, tiene un efecto considerable en la calidad y composición de ácidos grasos en los peces (Bransden y col., 2005; El-Sayed y col., 2005; Pickova y col., 2007; Schlechtriem y col, 2007).

Los resultados obtenidos en el análisis de estos subproductos de cangrejo ricos en lípidos y ácidos grasos poliinsaturados $\omega 3$ de cadena larga deben ser considerados como una innovadora fuente natural de los mismos para su uso en piensos para acuicultura.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Álvarez Aranguiz. A. (2007). Memoria final: Aprovechamiento del cefalotórax de cangrejo rojo como ingrediente de dietas para especies acuáticas [<http://www.roxocanval.org/Doc/CangrejoRojo.pdf>]

Berg, H.; Mågård, M.; Johansson, G.; Mathiasson L. (1997). Development of a supercritical fluid extraction method for determination of lipid classes and total fat in meats and its comparison with conventional methods. J. Chromatogr. A, 785: 345-352.

Booij, K.; Van den Berg, C. (1994). Comparison of techniques for the extraction of lipids and PCBs from Benthic invertebrates. Bull.Environ.Contam.Toxicol, 53: 71-76.

Bransden, M.P.; Battaglione, S.C.; Morehead, D.T.; Dunstan, G.A.; Nichols, P.D. (2005). Effect of dietary 22:6n-3 on growth, survival and tissue fatty acid profile of striped trumpeter (*Latris lineate*) larvae fed enriched *Artemia*. Aquaculture, 243: 331-344.

Çelik, M.; Türeli, C.; Çelik, M.; Yanar, Y.; Erdem, Ü.; Küçükgülmez, A. (2004). Fatty acid composition of the blue crab (*Callinectes sapidus* Rathbun, 1886) in the north eastern Mediterranean. Food Chemistry, 88: 271-273.

Chen, D.W.; Zhang, M.; Shrestha, S. (2007). Compositional characteristics and nutritional quality of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) Food Chemistry, 103: 1343-1349.

De la Cruz García, C.; López Hernández, J. ; Simal Lozano, J. (2000). Gas chromatographic determination of the fatty-acid content of heat-treated green beans. *J. Chromatogr. A*, 891: 367-370.

El-Sayed, A.F.M.; Mansour, C.R. y Ezzat, A.A. (2005). Effects of dietary lipid source on spawning performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock reared at different water salinities. *Aquaculture*, 248: 187- 196.

Gunnlaugsdottir, H.; Ackman, R.G. (1993). Three extraction methods for determination of lipids in fish meal: evaluation of a hexane/isopropanol method as an alternative to chloroform-based methods. *J.Sci. Food Agric*, 61: 235-240.

Heu, M.; Kim, J.; Shahidi, F. (2003). Components and nutritional quality of shrimp processing by-products. *Food Chemistry*, 82: 235-242.

Honeycutt, M.E.; Mcfarland, V.A.; McCant, D.D. (1995). Comparison of three lipid extraction methods for fish. *Bull.Environ.Contam.Toxicol*, 55: 469-472.

Katikou, P.; Robb, D.H.F. (2001). Evaluation and comparison of the CEM rapid extraction method with official standard methods for the determination of lipid content in fillets of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 194: 99-105.

Lane, R.L.L ; Trushenki, J.Y.; Kohler, C.C. (2006). Modification of fillet composition and evidence of differential fatty acid turnover in sunshine bass *Morone chrysops* x *M. saxatilis* following change in dietary lipid source. *Lipids* , 41: 1029-1038.

Li, Y.; Chen, W.; Sun, Z.; Chen, J.; Wu, K. (2005). Effects of n-3 HUFA content in broodstock diet on spawning performance and fatty acid composition of eggs and larvae in *Plectorhynchus cinctus*. *Aquaculture*, 245: 263- 272.

Manirakiza, P.; Covaci, A.; Schepens, P. (2001). Comparative study on total lipid determination using soxhlet, Roesse-Gottlieb, Bligh & Dyer extraction methods. *Journal Food Composition Analysis*, 14: 93-100.

Manning, B.B.; Li, M.H.; Robinson, E H.; Peterson, B. C. (2006). Enrichment of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fillets with conjugated linoleic acid and omega-3 fatty acids by dietary manipulation. *Aquaculture*, 261: 337-342.

Naczki, M.; Williams, J.; Brennan, K.; Liyanapathirana, Ch.; Shahidi, F. (2004). Compositional characteristics of green crab (*Carcinus maenas*). *Food Chemistry*, 88: 429-434.

Pickova, J.; Brännäs, E.; Andersson, T. (2007). Importance of fatty acids in broodstock diets with emphasis on Arctic char (*Salvelinus alpinus*) eggs. *Aquacult Int.*, 15: 305-311.

Sanches-Silva, A.; López-Hernández, J.; Paseiro-Losada, P.; Simal- Lozano, J. (2004). Study of the effect of light on fatty acids of potato crisps using a gas chromatographic method. *Analytica Chimica Acta*, 524 (1-2): 191-200.

Sanches-Silva, A.; Rodríguez- Bernaldo de Quirós, A.; López-Hernández, J.; Paseiro-Losada, P. (2003). Gas chromatographic determination of glycerides in potato crisps fried in different oils. *Chromatographia*, 58: 517-522.

Schlechtriem, C.; Bron, J.E.; Tocher, D.R. (2007). Inter-individual variation in total fatty acid compositions of flesh of Atlantic salmon smolts-fed diets containing fish oil or vegetable oil. *Aquaculture Research*, 38: 1045-1055.

Shahidi, F.; Synowiecki, J. (1991). Isolation and characterization of nutrients and value-added products from Snow crab (*Chionoecetes opilio*) and Shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 39: 1527-1532.

Undeland, I.; Härröd, M.; Lingnert, H. (1998). Comparison between methods using low-toxicity solvents for extraction of lipids from herring (*Clupea harengus*). *Food Chemistry*, 61: 355-365.

VII- COMPOSICIÓN NUTRICIONAL

VII-1. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL. DISCUSIÓN GENERAL

Para establecer la composición nutricional del cangrejo *Chionoecetes opilio*, se ha determinado el contenido en humedad que, en las muestras del 2003 se hizo por secado a vacío y 55 °C, después de la descongelación y evaporación del agua de la muestra al Baño María y en las muestras del 2005 se hizo a 100 °C en estufa de aire, con el fin observar la posible influencia de la temperatura en la composición nutricional.

En la composición total el contenido más elevado corresponde a las proteínas, seguidas de las cenizas y de los lípidos. La composición media de todos los cangrejos analizados se observa en la figura VII-1.

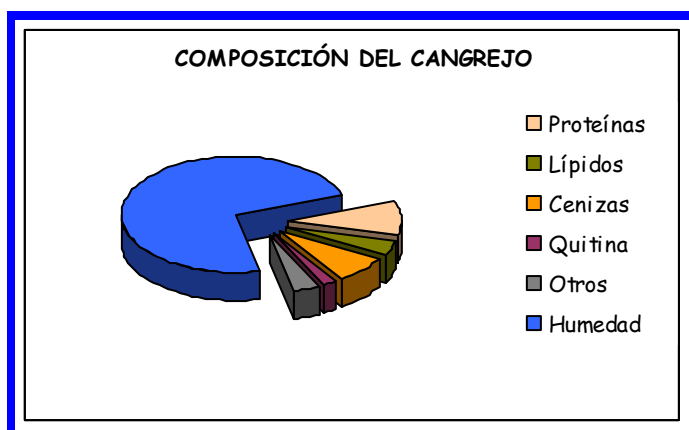


Figura VII-1: Composición media del cangrejo *Chionoecetes opilio*

Los resultados encontrados en el segundo muestreo para vitamina E y astaxantina son más bajos que en el primero, debido probablemente a la degradación causada por la mayor temperatura utilizada en la determinación de la humedad de las muestras (100 °C en estufa de aire en lugar de 55 °C a vacío), lo que ha significado una disminución del contenido de ambas en un grado importante. Esto puede ser tenido en cuenta a la hora del tratamiento

de las muestras. La comparación de los resultados se muestra en la figura VII-2.

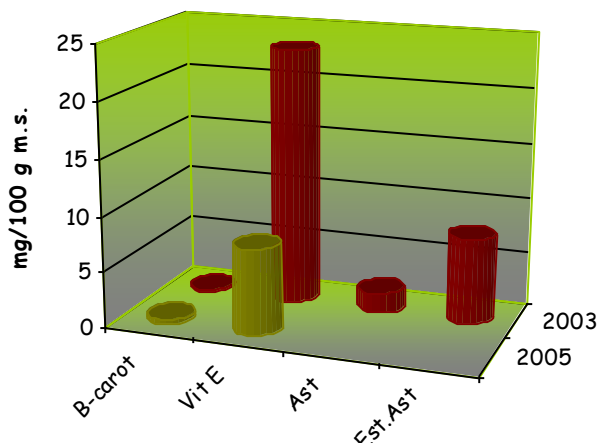


Figura VII-2: Contenido de β -caroteno, vitamina E, Astaxantina y Ésteres de astaxantina en ambos años de estudio.

Tanto el β -caroteno como la astaxantina y sus ésteres han sido cuantificados y confirmados por HPLC-MS.

Para el análisis de cenizas, en el muestreo de 2003 se hicieron las cenizas en el caparazón solo (si bien las muestras no presentaban en general mucho contenido) y en las del 2005 en muestra completa (que presentaban en general un contenido de relativa importancia). Los valores encontrados han sido elevados (valor medio 26.8 g/100 g ms). En la figura VII-3 se comparan los datos medios correspondientes a los dos años de muestreo para humedad, proteínas, grasas y quitina en muestra completa y cenizas correspondientes al caparazón en 2003 y a muestra total en 2005, observándose una mayor proporción de lípidos en las muestras correspondientes a 2005, y mayor proporción de cenizas en 2003, aunque en este último caso los datos no son

totalmente comparables por haberse realizado sólo este análisis en el caparazón en dichas muestras.

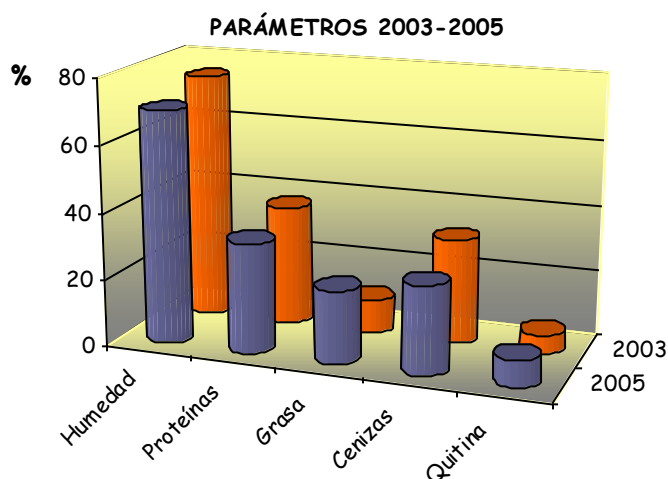


Figura VII-3: Comparación de datos medios de los parámetros analizados en los dos años de estudio.

El Fósforo, Calcio y magnesio se ha valorado directamente en las cenizas. Los valores más altos corresponden al calcio (valor medio 8,5 g/100g ms), seguidos del fósforo (valor medio 1,47 g/100g ms) y del magnesio (valor medio 0,9 g/100g).

Los aminoácidos proteínogénicos encontrados han sido los siguientes: leucina, arginina, glutámico, aspártico, serina, glicina, histidina, treonina, alanina, prolina, tirosina, valina, metionina, isoleucina, fenilalanina y lisina (Figura VII-4). Si se comparan los resultados por año de muestreo son un poco más elevados los valores de aminoácidos encontrados para las muestras recogidas en el año 2005 (Figura VII-4)

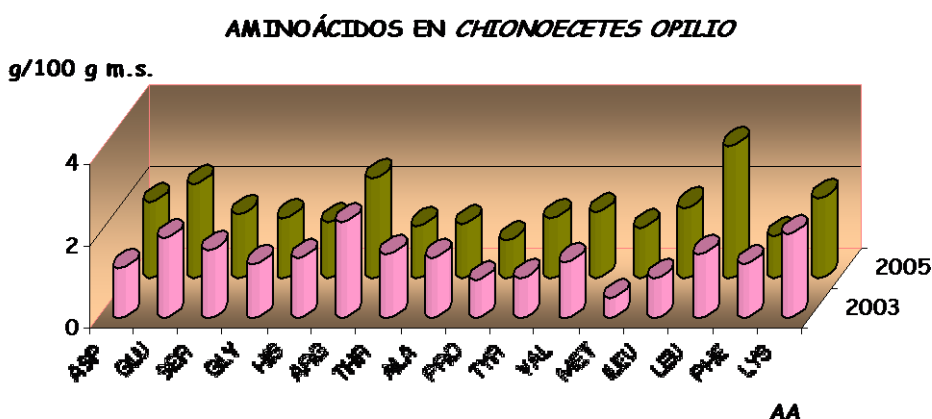


Figura VII-4: Aminoácidos analizados en ambos años de estudio en el caparazón del *Chionoecetes opilio*

El valor medio obtenido para quitina es de 6,8 g/100g ms. Comparando el resultado encontrado para cenizas y quitina en cada muestra se observa una relación inversa entre ambos contenidos. Las muestras del año 2003 presentan mayor contenido en ceniza y valores más bajos de quitina, mientras que en el año 2005 sucede lo contrario.

La media de los lípidos totales encontrados es de 16.03 g/100g ms, si bien son mucho más elevados los valores correspondientes a las muestras de cangrejos recogidos en el año 2005, en los que se observó, en el momento de la descongelación, un mayor contenido de sustancias residuales en los caparazones de la mayor parte de las muestras y que presentaban un aspecto graso.

Se han comparado en las figuras siguientes (VII-5 y VII-6) el contenido en lípidos y cenizas correspondientes a cada muestra y período de muestreo, encontrándose una correlación inversa entre ambos contenidos (Tabla VII-1).

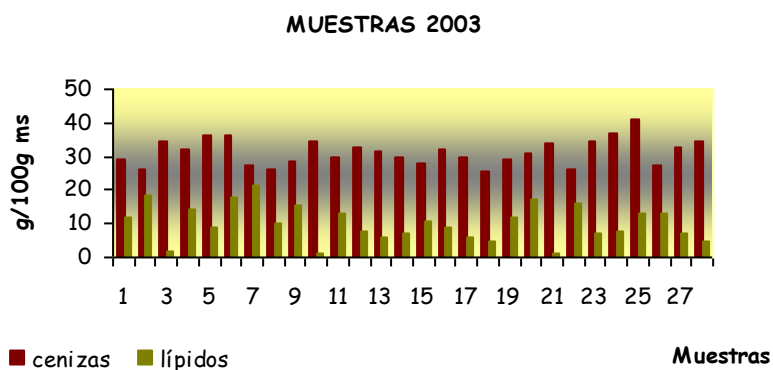


Figura VII-5: Contenido en lípidos y cenizas de los cangrejos del 2003

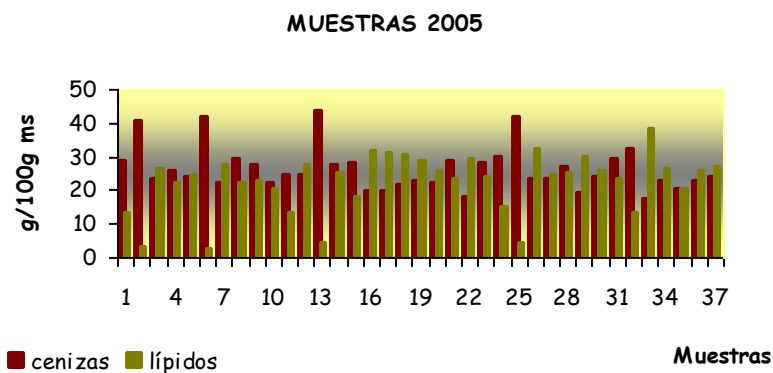


Figura VII-6: Contenido en lípidos y cenizas de los cangrejos del 2005

		LÍPIDOS	CENIZAS
Lípidos	Correlación de Pearson	1	-.797 (**)
	Sig. (Bilateral)		,000
	N	68	68
Cenizas	Correlación de Pearson	-.797 (**)	1
	Sig. (Bilateral)	,000	
	N	68	69

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Tabla VII-1: Correlaciones entre lípidos y cenizas

El perfil de los ácidos grasos es similar en todas las muestras. En la figura VII-7 se recoge la proporción relativa de los ácidos grasos. El porcentaje relativo menor corresponde a los ácidos grasos saturados (23.38%), estando los monoinsaturados y poliinsaturados en una proporción similar (38.68 % y 38.28% respectivamente). Destaca el elevado contenido en $\omega 3$ (32 %), siendo la relación $w6/w3$ de 0.06.

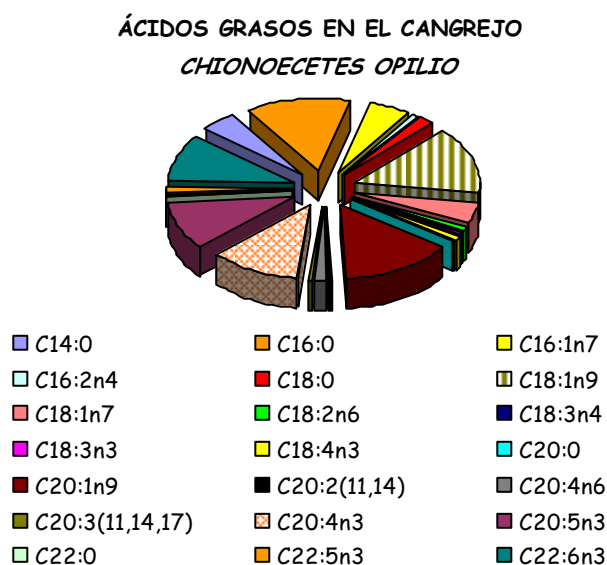


Figura VII-7: Proporción relativa de todos los ácidos grasos encontrados en las muestras

En las siguientes figuras (VII-8 y VII-9), se recoge la proporción relativa media de los ácidos grasos poliinsaturados presentes en el cangrejo Rojo, destacando como mayoritarios los ácidos grasos $\omega 3$ (C20:4n3, C20:5n3 y C22:6n3) que tienen un valor muy importante desde el punto de vista nutricional.

PROPORCIÓN RELATIVA DE ÁCIDOS GRASOS
POLIINSATURADOS EN *CHIONOECETES OPILIO*

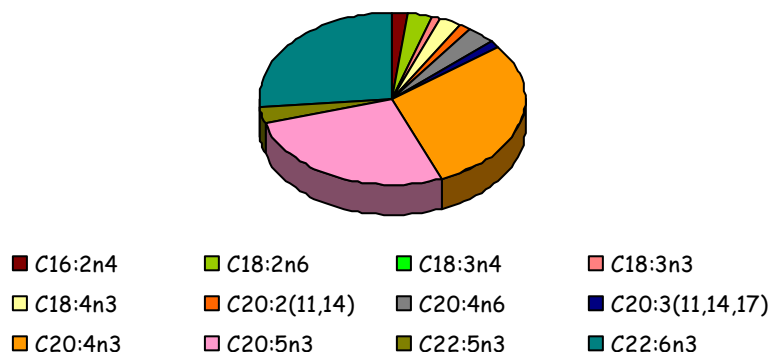


Figura VII-8: Proporción relativa de ácidos grasos poliinsaturados en el cangrejo *Chionoecetes opilio*.

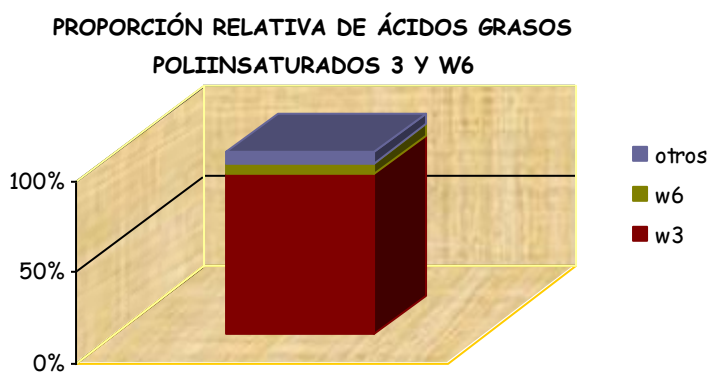


Figura VII-9: Proporción relativa de ácidos grasos poliinsaturados ω 3 y ω 6.

La composición proximal de los caparazones de varios crustáceos se muestra en la Tabla VII-2. El contenido en proteínas en nuestras muestras de cangrejo es más elevado que los recogidos por otros autores (Manu-Tawiah y Haard, 1987; Shahidi y Sinowiecki, 1991). Las diferencias observadas se deben principalmente al contenido en proteínas, ya que los subproductos del cangrejo contienen menos que los de los camarones (Shahidi y Sinowiecki, 1991; Heu y col, 2003), mientras que el contenido en

cenizas es similar. Sin embargo, el contenido de lípidos en los caparazones del *Chionoecetes opilio* fue más elevado (Ramamohanrao y col, 1983; Manu-Tawiah y Haard, 1987; Shahidi y Sinowiecki, 1991; Heu y col, 2003; Naczky y col, 2004).

Procedencia del cangrejo	Humedad	% Proteínas	% Lípidos totales (m.s.)	% Cenizas (m.s.)	Referencias
<i>Paratelphusa hydrodomus</i>			6.4		Ramamohanrao y Kallapur, 1983
<i>Chionoecetes opilio</i>		28	1	31	Manu-Tawiah y Haard, 1987
Camarón		41.9	1.7		Shahidi y Synowiecki, 1991
Parte trasera		17.8	0.75		
Patas de atrás		18.6			
Pinzas		17.2			
Patas		15.7			
Camarón Northern pink	79.1	44.5	2.9	39.2	Heu y col., 2003
Camarón Spotted	78.5	54.0	3.3	32.6	
<i>Green crab</i>			0.47		Naczky y col., 2004

Tabla VII-2: Composición proximal de caparazones de varios crustáceos

El caparazón del cangrejo de las nieves presenta un potencial económico importante debido a que su peso medio es similar a los pesos medios de otros cangrejos enteros, como el *Blue crab*, *Swim crab* (Gökoolu y Yerlikaya, 2003) o *Green crab* (Skonberg y Perkins, 2002).

Carne	Humedad	% Proteínas (m.s.)	% Lípidos totales (m.s.)	% Cenizas (m.s.)	Referencias
<i>Alaska king crab</i>	77.9	83.7	9.5	7.0	Krzeczowski y col 1971
<i>Carcinus maenas</i> :					Skonberg y
Carne garras (cruda)		80.0	2.4	10.4	Perkins, 2002
Carne garras (cocinada)		81.1	2.8	10.1	
Carne patas (cocinada)		80.1	5.7	10.4	
Gamba Northern pink	84.4	85.8	2.6	10.3	Heu y col, 2003
Gamba Spotted	83.1	88.2	1.8	8.9	
<i>Callinectes sapidus</i>	82.0	85.4	4.8	9.3	Gökoolu y
<i>Paralithodes</i>					Yerlikaya, 2003
<i>camtschatica</i>	81.5	90.6	4.3	9.4	
<i>Neptunus spp</i>	78.7	74.0	2.3	6.8	
<i>Cancer magister</i>	80.4	96.2	7.4	7.9	
<i>Portunus pelagicus</i>	75.8	77.9	4.2	9.0	
<i>P. sanguinolentus</i>	78.9	61.9	5.9	13.2	
<i>Scylla serrata</i>	75.5	60.5	5.3	5.9	
					Nacz y col, 2004
<i>Carcinus maenas</i>	81.8	81.8	4.2		
<i>Snow crab</i> (materia húmeda)		18.5	1.17		USDA, 2005
<i>Portunus pelagicus</i>					Musaiger y Al-
Cangrejo crudo	77.5	87.8	3.1	10.4	Rumaidh, 2005
Cangrejo cocinado	77.8	79.8	5.6	13.7	
<i>Callinectes sapidus</i>	78.5	89.4	2.1	9.7	Küçükgülmez y col, 2006
<i>Streptocephalus- dichotomus</i> (materia húmeda)	83.1	88.2	19	10	Velu y Munuswamy, 2007

Tabla VII-3: Composición proximal de la carne de varios crustáceos

La tabla VII-3 muestra el porcentaje de los valores promedio, expresados en materia seca, de humedad, proteínas, grasa y cenizas en la carne de varias especies de cangrejo estudiadas por otros autores; (Krzeczkowski y col, 1971; Skonberg y Perkins, 2002; Gökoolu y Yerlikaya, 2003; Heu y col, 2003; Naczki y col, 2004; Musaiger y Al-Rumaidh, 2005; USDA, 2005; Küçükgülmez y col, 2006). Estos y otros estudios (Velu y Munuswamy, 2007) evalúan el valor nutritivo de los crustáceos, como candidatos potenciales a ser utilizados en la elaboración de dietas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Gökoolu, N.; Yerlikaya, P. (2003). Determination of proximate composition and mineral contents of blue crab (*Callinectes sapidus*) and swim crab (*Portunus pelagicus*) caught off the Gulf of Antalya. Food Chemistry, 80: 495-498.

Heu, M.; Kim, J.; Shahidi, F. (2003). Components and nutritional quality of shrimp processing by-products. Food Chemistry, 82: 235-242.

Kallapur, V.L.; Ramamohanrao, Y.; Narasubhai, A.V. (1983). Glycolytic enzymes in the premolt field crab *Paratelphusa hydrodromus* (Milne-Edwards) (Crustacea). Arch. Int. Physiol. Biochimie, 91 (2): 127-132.

Krzeczowski, R.A.; Tenney, R.D.; Kelley, C. (1971). Alaska King crab, fatty acid composition, carotenoid index and proximate analysis. Journal Food Science, 36: 604-606.

Küçükgülmez, A.; Çelik, M.; Yanar, Y.; Ersoy, B.; Çikrikçi, M. (2006). Proximate composition and mineral contents of the blue crab (*Callinectes sapidus*) breast meat, claw meat and hepatopancreas. International Journal of Food Science and Tehnology, 41: 1023-1026.

Manu-Tawiah W; Haard NF (1987). Recovery of carotenoprotein from the exoskeleton of snow crab *Chionoecetes opilio*. Canadian Institute Food Sci. Technol. J., 20: 31-33.

Musaiger, A.O.; Al-Rumaidh, M.J. (2005). Proximate and mineral composition of crab meat consumed in Bahrain. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 56: 231-235.

Naczek, M.; Williams, J.; Brennan, K.; Liyanapathirana, C.; Shahidi, F. (2004). Compositional characteristics of green-crab (*Carcinus maenas*). *Food Chemistry*, 88: 429-439.

Shahidi, F.; Synowiecki, J. (1991). Isolation and characterization of nutrients and value-added products of Snow Crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39: 1527-1532.

Skonberg, D.I.; Perkins, B.L. (2002). Nutrient composition of green crab (*Carcinus maenas*) leg meat and claw meat. *Food Chemistry*, 77: 401-404.

USDA (2005)

[Available: <http://www.oceansalive.org/eat.cfm?subnav=fishpage&fish=21>]

Velu, C.S.; Munuswamy, N. (2007). Composition and nutritional efficacy of adult fairy shrimp *Streptocephalus dichotomus* as live feed. *Food Chemistry*, 100: 1435-1442.

VII-2. CONCLUSIONES

PRIMERA. Se ha analizado el contenido de vitaminas, minerales, proteínas, aminoácidos, quitina, ácidos grasos y lípidos totales de 70 muestras de caparazones del cangrejo *Chionoecetes opilio*, recogidas en el año 2003 (30 muestras) y en el año 2005 (40 muestras) con el fin de conocer su valor nutritivo y su posible aprovechamiento para la elaboración de piensos destinados a la acuicultura.

SEGUNDA. Para la extracción de vitaminas liposolubles y carotenoides se han comparado dos métodos, seleccionando la extracción con acetona ya que permite identificar y cuantificar la vitamina E, el beta-caroteno, la astaxantina y sus derivados.

Para el análisis se ha optimizado un método de HPLC con detectores de Fluorescencia y UV-VIS en serie. La separación fue llevada a cabo con una columna ODS2. La fase móvil utilizada fue metanol, acetonitrilo y hexano-diclorometano (50:50) en gradiente. El rango de flujo se situó entre 0.8 ml/min y 2 ml/min. La detección y cuantificación de vitamina E se realiza mediante el detector de fluorescencia (280-331 nm) mientras que el β -caroteno, astaxantina y derivados de la astaxantina mediante el detector UV-VIS (450 nm) Para la confirmación de todos los compuestos se utiliza HPLC-MS.

Los resultados muestran valores más elevados para la vitamina E (23.3 mg/100 g de m.s.) y astaxantina total (9.49 mg/100 g de m.s.) en el primer año de estudio (2003), mientras que los valores en el año 2005 fueron mucho más bajos, vitamina E (7.94 mg/100 g m.s.) y astaxantina total (0.29 mg/100

g m.s.), debido posiblemente a la degradación por efecto de la temperatura (100 °C) utilizada en la preparación de las muestras en el segundo año de estudio. El β -caroteno se ha encontrado en concentraciones mucho menores (0.2 mg/100 g de m.s. en el año 2003 y 0.48 mg/100 g m.s. en el 2005).

TERCERA. El contenido de cenizas en los caparazones del *Chionoecetes opilio* es elevado, del orden de 30 g/100 g m.s. y está correlacionado con el contenido en calcio (valor medio 8,5 g/100g ms), seguidos del fósforo (valor medio 1,47 g/100g ms) y del magnesio (valor medio 0,9 g/100g).

CUARTA. La determinación de proteínas se realizó mediante el método de Kjeldahl. La digestión se realizó con el equipo "Bloc-Digest", 30 minutos a 125 °C, otros 30 minutos a 200 °C y 120 minutos a 400 °C., seguida de una destilación semiautomática (Unidad Pro-nitro).

Se ha puesto a punto un método de HPLC para el análisis simultáneo de diecisiete aminoácidos en muestras de cangrejo mediante separación en fase reversa y detección UV (254 nm) previa derivatización con fenilisotiocianato. Se utilizó como fase móvil en gradiente tampón acetato sódico (0.14 N) con 0.05 % de TEA a pH 6.2 y acetonitrilo:agua (60:40). La separación de los aminoácidos se llevó a cabo con columna ODS2

Los resultados obtenidos indican contenidos altos en proteína, 35.52 g/100g m.s. y 32.97 g/100g m.s. en caparazón y contenido respectivamente para el 2003 con un valor medio de 33.2 g/100g m.s. para el 2005 y así como cantidades elevadas de aminoácidos, destacando la arginina, lisina, glutámico, serina y leucina, estando presentes todos los aminoácidos esenciales para el cultivo de peces.

QUINTA. Para el análisis de la quitina en los caparazones del cangrejo., se aplica un procedimiento de hidrólisis ácida simple y un método de HPLC con detector de índice de refracción (RI) que ha demostrado ser sumamente útil para la detección de este tipo de compuestos no-iónicos, eliminando el proceso de derivatización. La separación se realiza mediante columna ODS2. La fase móvil isocrática es 10 % de metanol y 90 % de hexanosulfonato a pH 2.1 y el flujo 1.5 ml/min. Para la confirmación se utiliza el HPLC-MS.

Los resultados medios de quitina encontrados oscilan entre 5.57 g/100g m.s. y 8.04 g/100g m.s. para el primer y segundo años de muestreo, respectivamente.

SEXTA. El contenido de lípidos totales en los caparazones del cangrejo *Chionoecetes opilio* se determinó mediante Soxhlet utilizando como solvente benzina de petróleo. La cantidad de grasa encontrada es elevada con un valor medio de 10.17 g/100g m.s. el primer año y casi el doble, 21.9 g/100g m.s. el segundo año.

El perfil de los ácidos grasos se determinó por cromatografía de gases con detector de ionización de llama previa metilación en la fase de extracción. La columna utilizada fue DB-Wax con película de polietilenglicol. Como técnica de confirmación se empleó el GC-MS.

El perfil mayoritario de los ácidos grasos de los lípidos de los caparazones del *Chionoecetes opilio* corresponde a los ácidos grasos poliinsaturados, especialmente w3 (38.27 %), con un 10.79 % de ácido eicosapentaenoico (EPA), un 8.75 % de ácido docosahexaenoico (DHA) y un 9.45 % de ácido eicosatetraenoico. La relación entre w6/w3 es de 0.06.

SEPTIMA. El caparazón del Cangrejo Rojo (*Chionoecetes opilio*), subproducto de la pesquería comercial, es muy abundante, tiene un alto valor nutritivo para los peces por su contenido en proteínas, aminoácidos proteinogénicos, lípidos con elevada proporción relativa de ácidos grasos mono y poliinsaturados (relación $w6/w3 = 0,06$), cenizas, calcio, fósforo y magnesio y quitina. Contiene además vitamina E, β -caroteno y astaxantina, si bien el tratamiento de la muestra va a ser determinante para evitar la posible degradación de estos últimos componentes. Todo ello unido al tamaño del caparazón de estos cangrejos con un peso húmedo medio superior a 100g (materia seca = 30g) hace de ellos una materia prima muy válida para su utilización en la fabricación de piensos destinados a acuicultura.

Las fotografías de la portada han sido tomadas de las páginas web:

http://www.javeriana.edu.co/.../INDEX_THUMBS.HTM

<http://www.fotoalbums.ldm.gov.lv/.../jura/21.s.jpg>

